

Université de Montréal

CONSÉQUENCE DU STRESS OXYDATIF DES EMBRYONS BOVINS  
CULTIVÉS *IN VITRO*

par

SALOUA BENMOUISSA

Département de biomédecine vétérinaire  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option reproduction

Décembre, 2005

©Saloua Benmouissa, 2005



SF

607

US4

2006

1.021

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Conséquence du stress oxydatif des embryons bovins cultivés *in vitro***

présenté par  
SALOUA BENMOUISSA

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D<sup>r</sup> Alan K. Goff, président-rapporteur  
D<sup>r</sup> Lawrence C. Smith, directeur de recherche  
D<sup>r</sup> Bruce Murphy, membre du jury

## RÉSUMÉ

Généralement, le taux d'oxygène utilisé pendant la culture *in vitro* (CIV) est en fonction du stade de développement de l'embryon et des besoins énergétiques accrus aux stades morula et blastocyste. Plusieurs études *in vitro* chez les mammifères ont prouvé que les embryons mâles se développent plus vite que les embryons femelles. Les niveaux relatifs d'expression de gènes liés au chromosome X comme G6PD et l'HPRT, jouent un rôle important durant le développement embryonnaire. La présente étude avait pour objectif de vérifier si une forte concentration d'oxygène à l'intérieur du milieu de culture des embryons bovins CIV au stade morula peut favoriser le développement des embryons femelles.

Des embryons bovins CIV au stade 138h de développement ont été exposés à différentes concentrations d'oxygène (5%, 20%, et 40%), et à 210h le taux de développement et le nombre de cellules viables ont été comparés. Lors de l'expérience II, le RT-PCR en temps réel a été utilisé pour analyser l'abondance relative (AR) des gènes G6pd et Hpvt. Ces mêmes embryons ont été sexés et le nombre de copies d'ADNmt a été quantifié pour voir si les radicaux libres (ROS) ont pu causer des dommages sur l'ADNmt.

Aucune différence significative n'a été notée entre les différents groupes en ce qui concerne le développement (35%, 34%, et 38% respectivement). De plus, aucune différence au niveau de la morphologie n'a été notée parmi les différents groupes. Par contre, l'AR de G6pd est significativement plus élevée chez les embryons femelles dans les groupes de 5% et 20% d'oxygène, mais aucune différence significative dans le groupe de 40%. L'AR du gène Hpvt est significativement plus élevée chez les embryons mâles dans le groupe de 40%, mais aucune différence significative à l'intérieur des groupes 5% et 20%. Parmi les résultats les plus caractéristiques de ce travail est, le pourcentage de sexe est significativement différent de 1:1 dans le groupe contrôle au stade morula j5 et au stade blastocyste j8 (70% mâles vs 30% femelles). Par contre on observe une tendance de l'augmentation des embryons femelles dans les groupes 20% (56% vs 44%) et 40% d'oxygène ( 54% vs 46%). Aucune différence significative du nombre de copies d'ADNmt

n'a été mesurée entre les différents groupes avec cependant une légère augmentation dans le groupe de 40%.

Ces résultats permettent de conclure que l'exposition pendant une courte période (12h) à une forte concentration d'oxygène, induit une altération du sexe-ratio et favorise les embryons femelles. D'autres études plus avancées sur les conditions de culture *in vitro* sont nécessaires pour confirmer si l'augmentation de la concentration d'oxygène jusqu'au stade blastocyste cause une prépondérance des embryons femelles sur les mâles.

Mots-clés : concentrations d'oxygène, sexe-ratio, gènes liés aux chromosomes-X, culture *in vitro*, embryons bovins

## **ABSTRACT**

Generally, the oxygen rate used during the in vitro culture (IVC) should be adjusted according to the stage of development of the embryo and the levels of energy required at the stages of morula and blastocyst. Several *in vitro* studies in the mammals shown that male embryos develop faster than females embryos. The relative levels of gene expression related to X chromosome such as G6PD and HPRT, plays a significant role during the embryonic development. The present study's purpose was to verify if a high oxygen concentration in IVC bovine embryos at the morula stage can support the development of female embryos.

Bovine IVC embryos at the stage 138h of development were exposed to different oxygen concentrations (5%, 20%, and 40%), and at 210 h the stage of blastocyst development and the number of cells were analyzed. During the experiment II, real time RT-PCR was used to analyze the relative abundance (RA) of some X-linked genes like G6PD and HPRT. The same embryos were sexed and the copy number of mtDNA was quantified in order to see if the free radicals (ROS) could damage the mtDNA.

No significant difference in development was noted between the groups (35%, 34%, and 38% respectively). Moreover, no morphological difference was noted among these groups. On the other hand, RA of G6PD was significantly higher in female embryos from groups exposed to 5% and 20% of oxygen, but no significant difference in the 40% group. HPRT RA was significantly higher in male embryos exposed to 40% oxygen, but no significant difference between the 5% and 20% groups. Among the most relevant results of this work, was the percentage of sex witch differed significantly from 1:1 in the control group at the D5 of morula stage and the D8 of blastocyst stage (70% males vs 30% females). On the other hand we observed a tendency of the female embryos to increase in the 20% (56% vs 44%) and 40% oxygen groups (54% vs 46%). No significant difference of the copy number of mtDNA was measured between the different groups with however a small increase in the 40% group.

These results make it possible to conclude that the exposure for a short period of time (12h) to a high concentration of oxygen, induced a shift in the sex-ratio in favor of females embryos. More advance studies on the conditions of *in vitro* culture are necessary in order to confirm if the increase in the oxygen concentration, until the blastocyst stage, causes a preponderance of the female embryos over male embryos.

Key words : oxygen concentrations, sex-ratio, X-linked genes, *in vitro* culture, embryos, bovine



## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS ET TRADUCTIONS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>01</b>
<b>2 CHAPITRE 2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>02</b>
2.1 <i>Problématique des techniques de reproduction assistée .....</i>	<i>02</i>
2.2 <i>Concentration d'oxygène et développement embryonnaire chez les mammifères .....</i>	<i>05</i>
2.2.1 <i>Les radicaux libres d'oxygène (ROS) et le stress oxydatif.....</i>	<i>06</i>
2.2.2 <i>Production et effets nocifs des ROS dans les ovocytes et les embryons.....</i>	<i>06</i>
2.3 <i>Sources endogènes des ROS .....</i>	<i>07</i>
2.4 <i>Les facteurs exogènes qui génèrent les ROS.....</i>	<i>10</i>
2.5 <i>Effets néfastes des ROS sur les embryons.....</i>	<i>12</i>
2.6 <i>Dimorphisme sexuel des embryons en culture in vitro.....</i>	<i>12</i>
2.6.1 <i>La compensation du dosage chez les mammifères.....</i>	<i>13</i>
2.6.2 <i>Gènes liés au chromosome X .....</i>	<i>13</i>
2.6.3 <i>Glucose-6-phosphate déhydrogénase (G6PD) et métabolisme.....</i>	<i>16</i>
2.6.4 <i>Hypoxanthine phosphoribosyle transférase HPRT.....</i>	<i>16</i>
2.6.5 <i>Métabolisme générale des embryons cultivés in vitro.....</i>	<i>18</i>
2.6.6 <i>Métabolismes de embryons bovins cultivés in vitro.....</i>	<i>19</i>
2.7 <i>CONCLUSION DE LA RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....</i>	<i>24</i>
<b>3 CHAPITRE 3. HYPOTHÈSE, OBJECTIFS ET ARTICLE.....</b>	<b>25</b>
3.1 <i>Hypothèse.....</i>	<i>25</i>
3.2 <i>Objectif.....</i>	<i>25</i>
3.3 <i>Article.....</i>	<i>26</i>
3.3.1 <i>Abstract.....</i>	<i>27</i>
3.3.2 <i>Introduction.....</i>	<i>28</i>
3.3.3 <i>Materials and methods .....</i>	<i>30</i>
3.3.4 <i>Results .....</i>	<i>33</i>
3.3.5 <i>Discussion.....</i>	<i>35</i>

3.3.6	
<i>Références</i> .....	44
<b>4 CHAPITRE 4. DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....	<b>50</b>
<i>4.1 Discussion générale</i> .....	<i>50</i>
<i>4.2 Conclusion</i> .....	<i>56</i>
<b>5 CHAPITRE 5. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>58</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1	Les gènes qui échappent à l'inactivation du chromosome X.....	15
Tableau 2	Les primers utilisés pour le RT-PCR (en temps réel) et pour le PCR...	39

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1.	Développement embryonnaire précoce chez les bovins ....	04
Figure 2.	Réaction de Haber-Weiss.....	06
Figure 3.	Interactions entre le glucose le métabolisme de purine et les radicaux libres d'oxygène.....	09
Figure 4.	Les principales sources des radicaux libres au niveau des ovocytes et des embryons.....	11
CHAPITRE 3		
Figure 1		41
Figure 2		42
Figure 3		43

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET TRADUCTIONS

μL	Microlitre
μM	Micromolaire
μm	Micromètre
μmol	Micromole
ADN (DNA)	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	ADN mitochondrial
AI	Insémination artificiel
AMP	Adénosine monophosphate
ANOVA	Analyse de variance
AR	Abondance relative
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Acides triphosphate
CIV	Culture <i>in vitro</i>
Cu	Cuivre
DNTP	Déoxyribonucléotides
EST	Expression de séquence tag
Fe	Fer
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
FSH	Follicule de stimulation d'hormone
G6PD	Glucose-6-phosphate déhydrogénase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HPRT	Hypoxanthine phosphorybosile transférase
ICM	Masse cellulaire intérieure (Bouton embryonnaire)
In vitro	En milieu artificiel, en laboratoire
In vivo	Dans l'organisme vivant
Kb	Kilobase (pairs de base)
LH	Hormone luteinisante
M	Molaire
MgCl <sub>2</sub>	Dichlorure de magnésium
MIV	Maturation <i>in vitro</i>
MMP	Métalloprotéinase matricielle
Ng	Nanogramme

NI	Nanolitre
$O_2^{\cdot -}$	Radical anion superoxyde
$OH^{\cdot}$	Radical hydroxyle
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
PAR	Région pseudoautosomale
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PH	Unité de mesure d'acidité et de basicité
$RO^{\cdot}$	Radical alcoxyle
$ROO^{\cdot}$	Radical peroxyde
ROS	Les radicaux libres d'oxygène
RT-PCR	Réaction de polymérisation en chaîne-transcriptase inverse
RT-PCRrt	Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel
SOD	Superoxyde dismutase
SOF	Synthétique du fluide d'oviducte
U	Unité
UI (IU)	Unité internationale
XIC	Centre d'inactivation du chromosome X
ZFX	Zinc finger protein (lié à X)

## DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à une personne dont l'appui n'a jamais failli, à ma génitrice, à ma formatrice, à mon éducatrice, à celle qui m'a « légué » son propre sang. En un mot, je dédie ce mémoire à ma mère tant aimée, **Fatima-Zahra Dahbi**, sans oublier l'amour et le soutien morale de mon très cher papa, **M'hamed Benmouissa**.

Ainsi qu'à mes très chers enfants que j'aime beaucoup **Félix, et Zacharie**, à mon très cher mari **Isaël Bourgier**, pour son soutien familial et moral ainsi que pour son grand amour qu'il m'accorde.

A tous mes frères et sœurs et spécialement mon petit amour, ma très chère sœur **Bouchra** qui est toujours pour moi une deuxième maman, ainsi que pour sa petite famille.

Et finalement à mes beaux parents **M<sup>r</sup> et M<sup>me</sup> Bourgier** pour leur soutien familial au Québec.

## **REMERCIEMENTS**

Je voudrais d'abord remercier Dieu de me permettre d'être chaque jour en contact avec les merveilles de sa création. J'espère demeurer au service de sa volonté tout au long de ma carrière en recherche.

Je voudrais témoigner, ici, des qualités de mon directeur, un éducateur dans le sens le plus noble du mot, qui considère la formation comme quelque chose de très sérieux. Il m'a permis d'acquérir une bonne dose d'autonomie. Ses propos ont captivé mon esprit par leur rigueur, leur cohérence et leur précision lors de nos nombreuses discussions. Par son excellence, sa motivation, son dévouement et son amour profond de la recherche, il est devenu pour moi le modèle à suivre. Je serais toujours reconnaissante au **Dr Smith** de m'avoir permis de travailler dans son laboratoire, de m'avoir témoigné de la confiance et de l'amitié et, enfin, de m'avoir insufflé cette passion de la recherche.

Je ne peux passer sous silence le rôle de **France Filion** dans cette aventure. Elle a été une amie formidable et une compagne de laboratoire inestimable : c'est à elle que je dois aujourd'hui la maîtrise de bien des techniques en biologie moléculaire.

À **Jacinthe Therrien, Carmen Léveillé, et Vilceu Bordignon** autres compagnons de laboratoire, je dis merci pour leur gentillesse et leur patience avec moi.

Merci aussi à madame **Micheline Sicotte** pour le travail de secrétariat tout au long de mon séjour au CRRA, travail toujours fait avec gentillesse, compétence et rapidité.

Des remerciements particuliers à mes amis **Madame Smith Sidinia, Hind Jamaledine, Donald Boucher, et Jae Gyu Yoo** pour leurs démonstrations d'amitié et d'affection qui m'ont soutenu pendant les jours les plus durs de ma rédaction.



## 1. CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Il est de connaissance commune que les embryons des mammifères dérivant de la super-ovulation *in vivo*, l'insémination artificielle et le rétablissement non-chirurgical sont de qualité supérieure à ceux dérivés de la fertilisation (FIV), de la maturation (MIV), et de la culture (CIV) *in vitro* (Lonergan et al. 2006). Un système de culture *in vitro* a été établi pour produire des embryons bovins. Cependant, la viabilité des embryons produits par FIV semble être en fonction de l'âge de l'embryon, l'étape du développement embryonnaire, les conditions de culture et la qualité des embryons. Jusqu'ici, plusieurs paramètres ont été étudiés en tant qu'indicateurs potentiels de la viabilité d'embryons produits *in vitro*. La problématique du sexe-ratio demeure, quant à elle, à être élucidée bien que mentionnée par plusieurs études (Gutierrez-Adan et al. 2000). En effet, il a été rapporté que les embryons mâles chez les mammifères se développent plus vite que les femelles et ce, jusqu'au stade blastocyste.

Il a été suggéré que sous certaines conditions de stress, les embryons mâles sont plus vulnérables que les femelles bien que leur fragilité physiologique est peu connue. Plusieurs facteurs en CIV induisent la formation de radicaux libres (ROS) et affectent le développement embryonnaire, dont le principal étant la concentration d'oxygène (Pérez-Crespo 2005).

Or, durant les stades précoces du développement embryonnaire, les deux chromosomes X chez les femelles sont actifs, ce qui leur donne le potentiel d'exprimer à un plus haut niveau les gènes liés au chromosome X, contrairement aux mâles qui n'en ont qu'une seule copie. Une inactivation de l'un des deux chromosomes X doit avoir lieu chez les femelles pour la compensation du dosage des gènes liés au chromosome X entre les deux sexes. Le gène Xist (x-inactive spécifique transcrit) joue un rôle important dans l'inactivation du chromosome X. Ce gène est exclusivement transcrit à partir du chromosome X inactif, qui a été détecté pour la première fois au stade deux cellules chez les embryons bovins. Cependant, l'inactivation du chromosome X n'est observée qu'au stade blastocyste précoce. Parmi les gènes liés au chromosome X impliqués dans le métabolisme et le contrôle des radicaux libres, on retrouve G6PD et HPRT (Wrenzycki et al. 2002).

## **2. CHAPITRE 2. Revue de la littérature**

### **2.1 Problématique des techniques de reproduction assistées**

Depuis quelques années, la base expérimentale classique (superovulation, rétablissement et transfert non-chirurgical des embryons bovins), de même que des technologies avancées de production d'embryons (production *in vitro* et clonage par transfert nucléaire de cellules somatiques), ont produit de l'information structurale et fonctionnelle sur la fertilisation, le développement et la qualité de l'ovocyte. Cette information confère une perspicacité accrue non seulement au niveau de ces technologies, mais également quant aux facteurs contribuant à la fertilité chez les bovins. Il est maintenant connu que les profils endocriniens périphériques et folliculaires ont une influence profonde sur la compétence de développement de l'embryon. Il est également bien établi que la manipulation des ovocytes ou des embryons est de nature à supporter le développement embryonnaire et fœtal (Greve et Callesen 2005). De récentes études ont également mis en lumière l'importance de facteurs épigénétiques dans la reproduction des bovins.

Des expériences visant le rétablissement non-chirurgical d'embryons d'animaux surovulés avec le sérum de gonadotrophine de juments gestantes, ont été conduites pour la première fois au milieu des années 70 (Greve et Callesen 2005). Ces techniques ont fourni un nouvel outil prometteur pour l'élevage du bétail. Le transfert d'embryons a été par la suite ajouté à la technique plus classique de l'insémination artificielle (AI), qui était d'utilisation courante. Ces développements ont ouvert la voie à une ère de recherche en biotechnologie de la reproduction des animaux d'élevage. La suroovulation, le rétablissement et le transfert non-chirurgical d'embryons chez des femelles à cycle oestrale synchronisé ont été atteints à l'aide de technologies plus avancées telles que la cryopréservation, la bissection et le sexage des embryons, la production d'animaux transgéniques et le clonage par transfert nucléaire de cellules somatiques.

Les techniques de production d'embryons *in vitro* se basent sur le prélèvement des ovocytes qui ont atteint un stade de développement adéquat dans le follicule ovarien. Seuls les ovocytes présents dans les follicules ayant un diamètre de plus de 2 mm, sont aptes au développement embryonnaire successif (Galli et Moor 1991). Les ovocytes sont prélevés dans les ovaires de l'animal après l'abattage (Galli 1994; Galli 1996; Lazzari 1993) ou bien ils sont prélevés dans les animaux vivants par voie intra vaginale une fois visualisée au moyen d'une sonde échographique (Galli et al. 2001). La typologie d'embryons produits, varie en fonction des modalités de prélèvement des ovocytes ainsi qu'en fonction de la valeur génétique des vaches donneuses. Au cours des vingt dernières années de nombreux progrès ont été faits dans le domaine de la maturation des ovocytes *in vitro*; durant les premières heures de maturation, les interactions entre les cellules qui entourent l'ovocyte (cellules de granulosa) et l'ovocyte même se sont révélées particulièrement intéressantes (Staigmiller 1984). La maturation *in vitro* est obtenue en 24 heures de culture à température et atmosphère contrôlées; ensuite, la semence congelée, habituellement utilisée pour l'insémination artificielle, est préparée pour la fécondation *in vitro*. Les spermatozoïdes sont séparés par centrifugation et activés par l'ajout d'héparine, ensuite ils sont mis en contact avec les ovocytes mûrs (Parrish 1986). Après 18-24 heures de culture avec les spermatozoïdes, les ovocytes sont déplacés dans un médium idoine au développement embryonnaire, et après 7 jours ils atteignent le stade de blastocyste, stade où ils peuvent être transplantés par voie intracervicale dans l'utérus d'une vache receveuse ou bien congelés et conservés dans l'azote liquide jusqu'au moment de l'implantation (Galli 1996). Le succès de la maturation *in vitro* est très importante (plus de 90% des ovocytes, atteint la deuxième métaphase), ainsi que celui de la fécondation *in vitro* (avec plus de 70%). La phase la plus critique (même pour sa durée temporelle) est le passage de l'ovocyte fécondé au blastocyste ce qui est présenté par la figure 1; à ce moment la réussite oscille entre 30 et 40%. La culture des zygotes de bovin dans l'oviducte de mouton (Eyestone 1987) permet de surmonter la plupart des difficultés provoquées par les systèmes inadéquats de culture. Il est cependant vrai qu'aujourd'hui, grâce au développement continu de nouvelles

formulations des médium semi définis (SOF, (Tervit 1972); CR1, (Rosenkrans 1994) on obtient des embryons de bonne qualité et appropriés à la congélation.

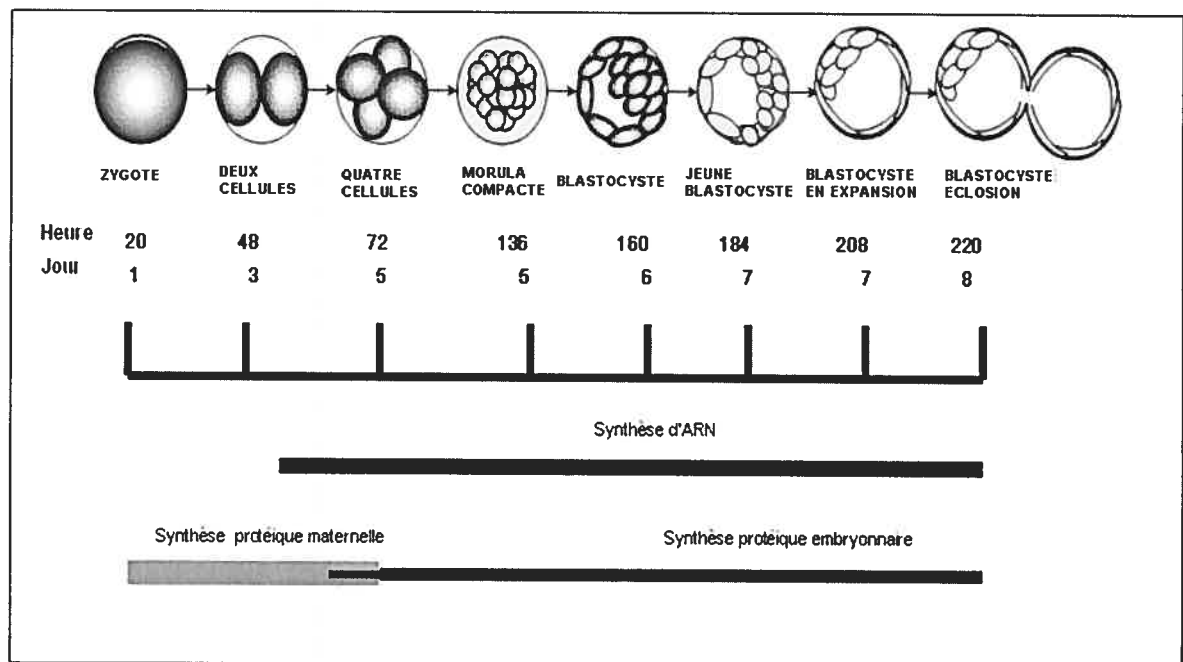


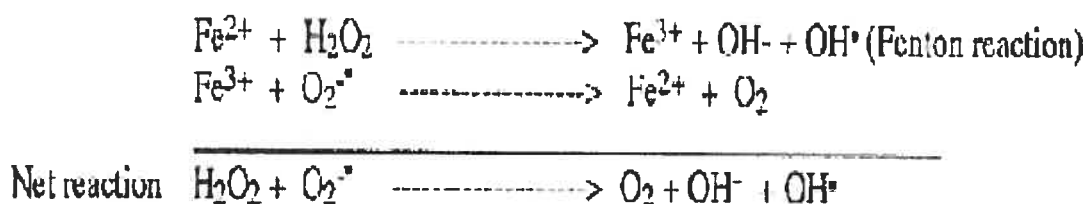
Figure 1 Développement précoce chez les embryons bovins.

## 2.2. Les radicaux libres d'oxygène (ROS) et le stress oxydatif

Sous des conditions normales de culture *in vitro*, le métabolisme aérobique de l'embryon produit des radicaux libres (ROS) (Guérin 2001b). Les ROS sont formés durant l'étape intermédiaire de la réduction de l'oxygène. Le radical anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) correspondent à l'étape de réduction de un, deux et trois électrons, respectivement. La combinaison des ROS avec d'autres atomes ou molécules peut entraîner la formation des radicaux alcoyl ( $RO^{\cdot}$ ) ou de peroxyde ( $ROO^{\cdot}$ ), en occurrence dans les lipides (Guérin 2001b), ainsi que l'activation de la molécule d'oxygène peut être catalysée par de petites molécules (e.g. xénobiotiques) et par les complexes de fer.

Des molécules à faible poids moléculaire exogènes (et endogènes) peuvent catalyser le transfert des électrons d'oxygène (menant à la formation du radical  $O_2^{\cdot-}$ ) à partir de plusieurs réductases (e.g. réductase NADPH, NADH déshydrogénase, xanthine déshydrogénase et l'aldéhyde oxydase) (Halliwell 1989). Le cycle d'oxydoréduction explique les effets toxiques de plusieurs composants exogènes (dérivés aromatiques, nitro-hétérocyclique et complexes de fer). Ces composants peuvent aussi générer des ROS par l'activation directe du NADPH oxydase (Halliwell 1989). La combinaison d' $H_2O_2$ , avec l'anion super oxyde peut endommager les cellules par le déclenchement de plusieurs réactions métaboliques ainsi que par les radicaux hydroxyles. Cette formation se produit par le biais de l'enzyme super oxyde dismutase (SOD) et la réaction de Haber-Weiss (figure 2), dont la dernière réaction a été accélérée par l'ajout catalytique de sels de métaux (fer ou cuivre) (Halliwell 1989).

De plus l'  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ , le radical hydroxyle ( $HO_2^{\cdot}$ ), et l'acide conjugué de l'anion super oxyde jouent un rôle important dans l'initiation de la chaîne de réactions de peroxydation des lipides de la membrane (Alvarez and Storey 1995; Bielski 1983). Cependant, la faible valeur de  $pK_a$  démontre qu'au pH 7.2-7.4 (Dale et al., 1998), la concentration d' $HO_2^{\cdot}$  est insignifiante. Or certaines études se sont concentrées sur les radicaux  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , et  $OH^{\cdot}$ , qui sont entre autres impliqués dans le stress oxydatif des gamètes et des embryons (Guérin 2001b).



**Fig. 2 : La réaction de Haber-Weiss**

### **2.2.1 Concentration d'oxygène et développement embryonnaire chez les mammifères**

La concentration d'oxygène durant le développement embryonnaire est un facteur important pour l'activation des voies métaboliques essentielle et est également à l'origine de la production de dérivés actifs de l'oxygène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  et  $\text{OH}^\bullet$ ) (Guérin 2001b). Ces dérivés actifs de l'oxygène agissent sur les acides gras insaturés de la membrane cellulaire et génèrent des hydro peroxydes lipidiques, dont le catabolisme par des métaux de transition, (Fe et Cu) se traduit par une mort cellulaire.

### **2.2.2 Production et effets nocifs des ROS dans les ovocytes et les embryons**

Le métabolisme de la molécule d'oxygène est important dans le développement des embryons (Houghton et al. 1996; Thompson 1996). Le taux de consommation moyenne d'oxygène dans les embryons bovins au stades morula et blastocyste est de 2 nl (nanolitre) par embryon, par heure (Overstrom 1992). La production des ROS par les embryons, comme il a été rapporté à plusieurs reprises, se présente avec trois principales caractéristiques :

- les trois principaux ROS ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , et  $\text{OH}^\bullet$ ) sont produits par l'embryons, par exemple,  $\text{O}_2^-$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont produits par des embryons lapins au stades blastocyste entre le jour 4 et 5 post-coït et persiste jusqu'au stade de préimplantation (Manes and Lai 1995);
- le niveau de cette production est particulièrement important durant la culture *in vitro*. Une augmentation de la production d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été mesurée chez les embryons

souris cultivés *in vitro* comparativement aux embryons produits *in vivo* (Goto et al. 1993);

- la somme des ROS produits varie en fonction du stade de développement. L'élévation de la production des ROS chez la souris se produit à deux occasions : au moment de la fertilisation et lors de la deuxième phase G2/M du cycle cellulaire (Nasr-Esfahani and Johnson 1991). Les ROS peuvent provenir des gamètes, des embryons ou à partir de leur environnement (Guérin 2001b).

### 2.3 Sources endogènes des ROS :

Les ROS peuvent être produits par plusieurs voies métaboliques et enzymatiques, dont la phosphorylation oxydative et par l'action des enzymes NADPH (Manes et Lai 1995) et xanthine oxydases (Alexiou et Leese 1992).

Les embryons au stade pré-implantation génèrent la formation d'adénosine triphosphate (ATP) via la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et la glycolyse (Thompson et al. 2000). L'inhibition de l'OXPHOS réduit la production des ROS et a un effet positif sur les embryons produits *in vitro* chez les espèces porcine (Machaty 2000) et bovine (Thompson et al. 2000). Les embryons souris métabolisent presque 70% de l'oxygène via l'OXPHOS au stade blastocyste et moins de 30% aux stades 2 et 4 cellules (Trimarchi et al. 2000).

Une forte concentration de glucose a un effet néfaste sur les embryons cultivés *in vitro*. Les embryons de rats diabétiques montrent une augmentation d'ARNm qui codent pour (Mn)-SOD mitochondriale, et une diminution d'ARNm correspondant aux catalases (Forsberg et al. 1996). Ces observations suggèrent que les ROS d'origine mitochondriale, via OXPHOS, sont quantitativement importants quand l'embryon est en présence d'une grande quantité de glucose.

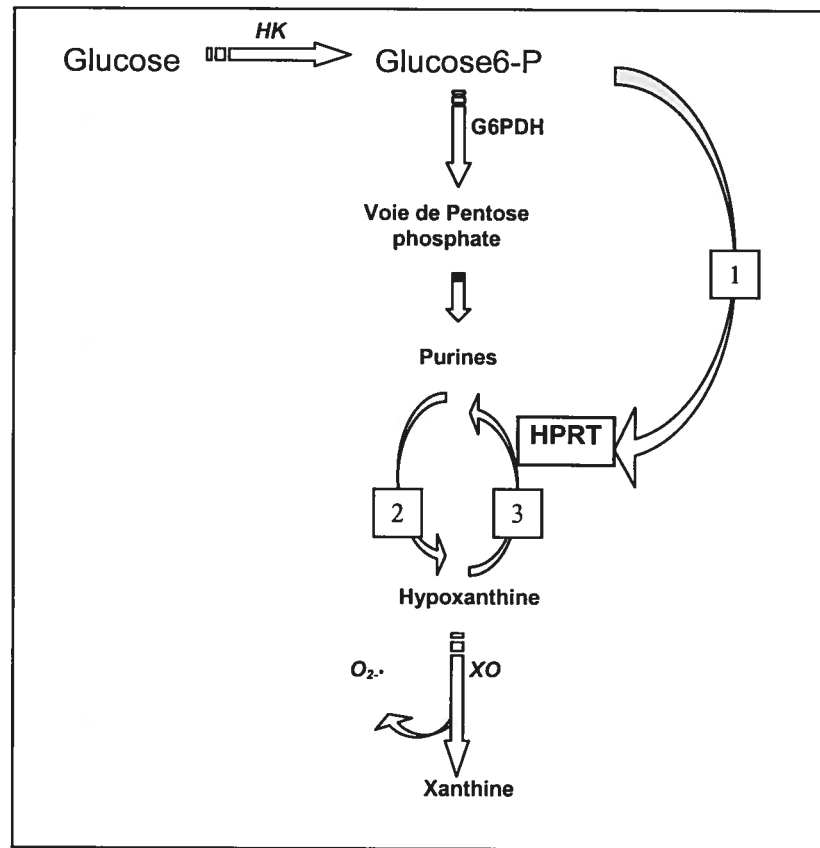
Cependant, les inhibiteurs mitochondriaux n'altèrent pas la production des ROS chez les embryons souris (Nasr-Esfahani et Johnson, 1991). L'activité des enzymes NADPH et xanthine oxydase est détectable chez les embryons au stade pré-implantation (Filler and Lew 1981).

La production de l'anion superoxyde et l' $\text{H}_2\text{O}_2$  via le NADPH oxydase a été décrite au niveau des blastocystes chez le lapin (Manes et Lai 1995). Également, l'incubation des embryons souris au stade deux cellules avec un inhibiteur de NADPH oxydase induit une réduction dose dépendante de la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nasr-Esfahani et Johnson 1991).

Il a aussi été montré (Alexiou et Leese 1992) que la xanthine est le principale produit du métabolisme des purines durant le stade préimplantation des embryons souris. L'inhibition de l'enzyme xanthine oxydase entraîne la diminution des ROS au niveau des embryons (Nasr-Esfahani et Johnson 1991) alors que l'hypoxanthine cause le blocage des embryons souris au stade deux cellules (Loustradis 1987) alors que les purines inhibent le développement des embryons souris *in vitro* (Noureddin 1990). Cependant l'activité de l'enzyme xanthine oxydase n'a pas été observée au stade blastocyste chez la souris (Alexiou et al., 1994).

De plus, l'inhibition de l'activité d'HPRT induit la conversion de l'hypoxanthine en xanthine sous l'action de la xanthine oxidase, dont le produit c'est l'anion super oxyde. Chez la souris en CIV le glucose inhibe l'activité d'HPRT ce qui entraîne un arrêt du développement (Figure 3) (Downs et Dow 1991).





HK: hexokinase  
 G6PD: Glucose-6-phosphate déshydrogénase  
 HPRT: Hypoxanthine phosphoribosyle transférase  
 XO: Xanthine oxidase

**Figure 3 :** Interactions entre le glucose, métabolisme de purine et les radicaux libres d'oxygènes. 1 Le glucose inhibe l'activité de l'hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) au niveau de l'embryon et, par conséquent, induit une augmentation de la production d'hypoxanthine. 2 Dégradation des bases purines, 3 Récupération des bases purines. (Downs et Dow., 1991)

## 2.4 Les facteurs exogènes qui génèrent les ROS

Plusieurs facteurs peuvent augmenter la production des ROS par l'embryon, tel qu'illustré par la Figure 4. La tension d'oxygène au niveau de l'oviducte varie approximativement entre le quart et le tiers de la tension atmosphérique (Mass 1976; Mastroianni and Jones 1965). Or à 37° C, la concentration d'oxygène dans un milieu équilibré avec la concentration atmosphérique est de 224  $\mu\text{mol/l}$  (Jones 1985). Celle-ci est considérablement plus élevée que la concentration physiologique dans les cellules qui est de 10  $\mu\text{mol/l}$  (Guérin 2001b). Les oxydases sont d'état  $\text{O}_2^-$  et leur valeur  $K_m$  d' $\text{O}_2$  est plus élevée que la concentration physiologique dans les cellules. Par conséquent, les conditions hyperoxiques peuvent augmenter l'activité de cette enzyme, et bien sûr une élévation d' $\text{O}_2^-$ , dans les cellules. La quantité de ROS produite par les embryons souris (Goto et al. 1993) et bovins (Nagao 1994) augmente durant la culture *in vitro* à une concentration d'oxygène atmosphérique. Au contraire, une concentration d'oxygène réduite favorise le développement embryonnaire chez la souris (Goto et al., 1993) et les ruminants (Pabon et al. 1989).

D'autres facteurs contribuent également à la production des ROS tels que les cations métalliques (Naser-esfahani 1990b), la lumière (Goto et al., 1993) ainsi que le temps d'exposition à la semence (Alvarez et al. 1996).

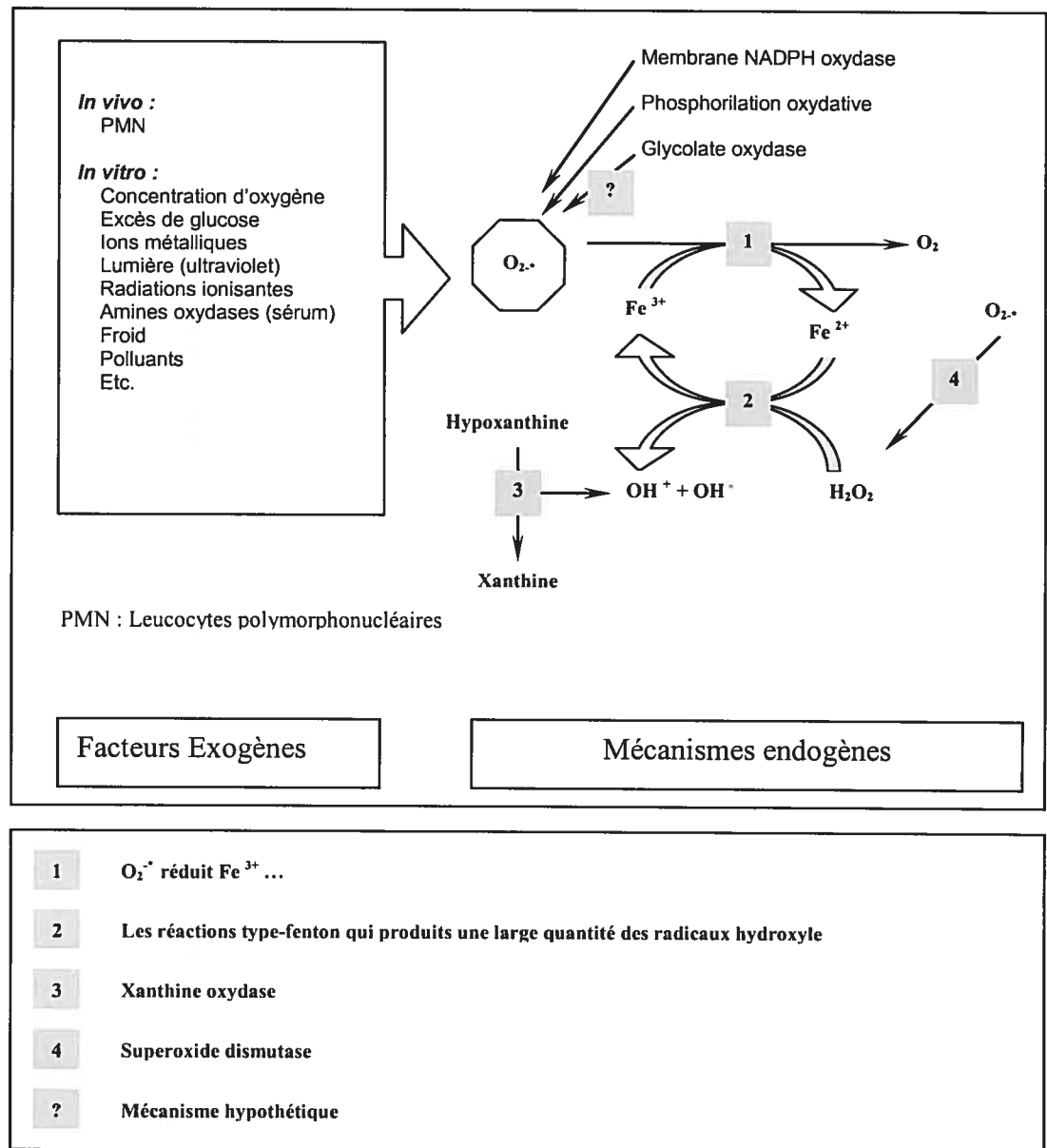


Figure 4 : Les facteurs exogènes et endogènes qui induisent la formation des ROS au niveau des ovocytes et des embryons. (Guérin, P et al., 2001)

## 2.5 Effets néfastes des ROS sur les embryons

Le stress oxydatif semble être à l'origine de plusieurs types de dommage à l'embryon allant de l'altération mitochondriale au blocage des cellules embryonnaires, en passant par un appauvrissement en ATP et l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Guérin 2001b).

Les ROS ont été impliqués dans l'altération du développement des embryons mammifères cultivés *in vitro* (Johnson et Nasr-Esfahani 1994). Le blocage au stade 2 cellules observé chez les embryons souris cultivés *in vitro* est associé à une élévation de ROS (Naser-esfahani 1990a; Noda et al. 1991) alors qu'aucun effet n'a pu être observé *in vivo* (Noda et al., 1991). Les effets néfastes des ROS pendant la maturation d'ovocyte peuvent changer le développement des embryons bovins (Blondin et al. 1997). De plus, le stress oxydatif occasionne de nombreux dommages à l'embryon par le biais de la peroxydation des lipides (Nasr-Esfahani et al. 1990a; Noda et al. 1991), l'oxydation protéique (Halliwell 1989), la fragmentation de l'ADN (Munné 1991), les dommages à l'ADN mitochondrial (Richter 1985) et également par le biais de la dégradation de l'ATP (Hyslop 1988).

## 2.6 Dimorphisme sexuel

Plusieurs études chez les mammifères comme la souris (Tsunoda 1985; Valdivia et al. 1993) et les bovins (Avery 1991; Xu et al. 1992), ont démontré que les embryons mâles se développent plus vite que les embryons femelles. De plus chez les humains Pergament et al. (1994), ont constaté que lors de la culture *in vitro* les embryons mâles sont plus dominants (6:1) que les embryons femelles. De ce fait de multiples raisons peuvent être citées ; entre autre, les composants du milieu de culture *in vitro* affectent la survie des embryons femelles et par conséquent peuvent altérer le sex-ratio (Bredbacka and Bredbacka 1996; Gutierrez-Adan et al. 1996). Une autre étude suggère que la présence de glucose dans le milieu de culture *in vitro* peut en être la cause surtout si la concentration de ce dernier se rapproche ou est égale à la concentration rencontrée dans le sérum ou dans les milieux commerciaux utilisés pendant les manipulations, (Gutierrez-Adan et al. 2001;

Larson et al. 2001; Peippo et al. 2001). Dans de telles conditions les embryons femelles enrichissent le stade morula mais n'entament pas le stade blastocyste. Une explication plausible pour ce phénomène est que les embryons femelles possèdent deux chromosomes-X actifs jusqu'au stade blastocyste, donc plus susceptible au déséquilibre du dosage métabolique à cause de la double expression liée au chromosome X, (Gutierrez-Adan et al. 2000; Wrenzycki et al. 2002).

### **2.6.1 La compensation du dosage chez les mammifères**

Dans les cellules somatiques des femelles mammifères, un des deux chromosomes X devient inactif au moment de la transcription pour balancer l'expression génétique des mâles à un seul chromosome X (Mary Lyon 1961). Le chromosome inactif se condense et s'attache à la membrane nucléaire pour former ce qu'on appelle le body Barr (Ohno et al. 1959). On présume donc que l'inactivation du chromosome X a lieu:

- au début du développement embryonnaire ;
- le chromosome X paternel ou maternel peut être inactivé;
- propagée dans les lignées cellulaires.

Le gène Xist (X-inactive spécifique transcrit), joue un rôle important durant l'inactivation du chromosome X (Wrenzycki et al. 2002). Ce gène est exclusivement transcrit à partir du chromosome X inactif. L'expression de ce gène a été détectée pour la première fois au stade deux cellules chez les embryons bovins (De La Fuente et al. 1999). Cependant, l'inactivation du chromosome X n'est observée qu'au stade jeune blastocyste.

### **2.6.2 Gènes liés au chromosome X**

Bien que la plupart des gènes situés au niveau du chromosome X inactif sont amortis, on en a découvert quelques-uns qui échappent à l'inactivation (Disteche 1995). Plusieurs de ces gènes se trouvent au niveau du domaine PAR, dont plusieurs ayant un homologue sur le chromosome Y. Ceci peut être expliqué par le fait que certains gènes échappent à la méthylation d'ADN par manque d'inactivation (Goodfellow et al. 1988), acétylation d'histone (Gilbert and Sharp 1999), et méthylation d'histone (Boggs et al.

2002). Or, plus que 30 gènes sont exprimés à partir du chromosome X inactif (voir tableau 1 révisé par Heard et al. 1997).

Lors de récentes études, on a examiné 224 gènes et EST transcrits dans un ensemble de cellules somatiques hybrides souris/humains contenant seulement un chromosome X inactif humain normal et on a détecté l'expression de 34 transcrits, suggérant qu'ils ont échappé à l'inactivation (Carrel et Willard 1999). De ces 34 transcrits, 31 sont localisés sur le bras p du chromosome X, ce qui implique que les deux bras sont épigénétiquement distincts.

Chez la souris, beaucoup de gènes échappent à l'inactivation de X, ceux-ci incluent *Smcx* (Agulnik et al. 1994), *Sts* (Salido et al. 1996) et *UTX* (Greenfield et al. 1998). Ceci peut expliquer le développement et la fertilité relativement normaux chez la souris avec le syndrome de Tourneurs (XO) alors que plusieurs effets sont notés chez l'humain (Karyotype 45, X). Chez l'humain, seulement 1% de Tourneurs survivent à la naissance, toutefois la souris de génotype XO peut être phénotypiquement normale et produire des descendants (Ashworth et al. 1991). Ceci confirme l'hypothèse que les humains ont besoin de la transcription double de quelques gènes liés au chromosome X. Une étude récente de l'inactivation de X chez les bovins a démontré que les gènes *G6PD* et *HPRT* sont sujets à l'inactivation de X alors que *ZFX* échappe à l'inactivation de X (Basrur et al. 2004). On a constaté que *SMCX* est sujet à l'inactivation, ce qui n'est pas le cas chez les humains et la souris.

Gene	Escaping human	Escaping mouse	Escaping bovine
GSI	y	n	?
KAL	y*	n	?
UBE1	y*	n	?
ANT3	y	n	?
XE7	y	n	?
MIC2	y	n	?
XG	y	n	?
RPS4X	y*	n	?
STS	y*	y*	?
ARSD	y	n	?
ARSE	y	n	?
SSX	y	n	?
SB1.8	y	n	?
PCTK1	y	n	?
DFFRX	y	n	?
IL9R	y	n	?
WI-12682	y	n	?
UTX	y* (1)	y*	?
DDX3	y* (1)	y*	?
EIF2S3	y (1)	y*	?
TMSB4X	y* (1)	n	?
PRKX	y* (1)	?	?
TBL1X	y* (1)	n	y (2)
EFIF1A	y* (1)	?	?
USP9X	y (1)	n	?
MID1	n (1)	y*	?
SMCX	y*	y*	n (4)
G6PD	n (3)	n	n (4)
HPRT	n	n	n (4)
ZFX	y*	n*	n (4)

\* has a known Y homologue

All are reviewed in Heard et al. 1997 except

(1) Distèche et al. 2002

(2) Xue et al. 2002

(3) Migeon 1983

(4) Basrur et al. 2004

**Tableau 1 : Les gènes qui échappent à l'inactivation du chromosome X chez l'humain, souris et bovins. (Heard et al., 1997)**

### 2.6.3 Gènes liés au chromosome X et au métabolisme

Parmi les gènes liés au chromosome X et qui sont impliqués dans le métabolisme énergétique, on retrouve le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et l'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPRT) (Gutierrez-Adan et al. 2000). Ces gènes jouent également un rôle dans le contrôle des radicaux libres et influencent le développement embryonnaire. La transcription des deux gènes G6PD et HPRT est plus élevée chez les embryons femelles bovins et souris (Gutierrez-Adan et al. 2000; Lonergan et al. 2000); ce qui prouve l'activité des deux chromosomes X. Cette expression dimorphique des gènes au stade précoce du développement confirme que les différences entre les deux sexes s'installent avant la différenciation des gonades, ce qui est le cas pour G6PD et HPRT. En utilisant cette expression accrue, les embryons femelles se développent plus rapidement au stade compact et 8 cellules en culture *in vitro* (Peippo and Bredbacka 1995) comparativement aux mâles qui se développent plus rapidement par la suite.

### 2.6.4 Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et métabolisme

L'enzyme G6PD est un housekeeping gène, hautement conservé dans l'évolution (Kletzien et al. 1994; Vulliamy et al. 1992) catalysant l'étape d'engagement du glucose-6-phosphate dans la voie des pentoses pour la production du NADPH et D-Ribose (Stryer 1989). Cette enzyme contrôle la vitesse de cette voie des pentoses. Mais cette voie n'est pas irréversible, car en absence de G6PD, la synthèse de pentose phosphate provient de la voie transketolase-transaldolase (TK-TA) (Pandolfi et al. 1995). Ainsi, pour contribuer à une croissance cellulaire rapide et à la réponse au stress oxydatif, la G6PD doit être présente à un niveau optimal (Rieger 1992a). Cette enzyme est également considérée comme le candidat principal impliqué dans les différences entre les deux sexes (Wrenzycki et al. 2002).

En ce qui concerne le stress oxydatif, l'oxygène et les radicaux libres ont un effet léthal sur les cellules mammifères dépourvues de G6PD, ce qui n'est pas le cas au niveau de d'autres cellules et des embryons de d'autres espèces (Gorry et al. 1994; Rudnicki et al. 1992).



Or, les cellules dépourvues de G6PD sont hypersensibles au stress oxydatif, laissant supposer la possibilité que ce gène joue un rôle particulier dans la capacité de ces cellules de croître en une colonie visible (Pandolfi et al. 1995). Cependant quand on réduit la pression d'oxygène en culture de cellules contrôles qui ont toujours la G6PD, l'efficacité de clonage diminue légèrement alors que chez les cellules dépourvues de G6PD, l'efficacité de clonage augmente significativement (Pandolfi et al. 1995). Ceci confirme que la faible efficacité du clonage peut être une conséquence du stress oxydatif.

Or, les cellules dépourvues de G6PD sont viables, leur taux de développement initial est normal, mais diminue au fur et à mesure que la densité augmente, laissant supposer que quelques catabolismes peuvent limiter ou inhiber la croissance (Pandolfi et al. 1995). Durant le stress oxydatif cellulaire d'origine endogène ou environnemental, le G6PD maintient le NADPH sous sa forme réduite qui à son tour, joue un rôle critique dans le maintien de glutathion (GSH) sous sa forme toujours réduite qui est essentielle à la détoxification des ROS et hydroperoxydes lipidiques (Halliwell 1989; Wells and Winn 1996)

Il est remarquable que les locus de HPRT et de G6PD sont situés étroitement : les études de ces deux familles indiquent des recombinaisons considérables. Puisque le locus de G6PD est situé à la bande terminale du bras long du chromosome X(Xq28), et que celui de HPRT est à Xq27 et puisque l'endroit altérable est situé à l'interface entre ces deux bandes, il y'a de fortes chances qu'un crossing-over peut se produire dans le segment du chromosome X entre les locus de HPRT et de G6PD. On a étudié les translocations de l'autosome-X au niveau des hybrides de cellules somatiques, et il a été prouvé qu'un (breakpoint) à la jonction de Xq27-Xq28 sépare HPRT de G6PD (Pai et al. 1980). G6PD est situé d'une manière distale à Xq28, alors que HPRT est localisé entre les segments Xq26 et Xq27. On a décrit 6 nouvelles variantes de G6PD chez les embryons mâles, toutes associées à l'insuffisance des enzymes présentant des signes d'hémolyse. Ils ont trouvé en générale 19 variantes sporadiques de G6PD (Sansone et al. 1981).

Le protomère de G6PD a un poids moléculaire de 58.000 Daltons et se compose de 531 acides aminés (Takizawa et al. 1986). Martini et al. (1986) ont déterminé que le gène

humain de G6PD est de long 18 Kb, avec 13 exons. La région de protéine-codante est divisée en 12 segments, s'étendant entre 12 et 236 pb, et un intron présent dans la région 5-prime non traduite. La majeure partie 5-prime terminale de l'ARNm mature de G6PD au niveau de plusieurs lignées cellulaires, est située à 177 pb «upstream » du codon du départ.

### **2.6.5 Hypoxanthine phosphoribosyle transférase (HPRT)**

L'hypoxanthine phosphoribosyle transférase (HPRT) est une enzyme purine qui catalyse la réaction de phosphoribosyle pyrophosphate (PRPP) avec l'hypoxanthine pour former le nucléotide inosine mono phosphate (IMP). L'enzyme hypoxanthine phosphoribosyle transférase peut catalyser cette réaction également avec la guanine avec une cinétique similaire. Pour cette raison, cette enzyme est également connue sous le nom d'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) (Konecki et al. 1982). L'hypoxanthine est non toxique dans le catabolisme intermédiaire des nucléotides purine (Voet 1990). Si elle n'est pas récupérée par l'enzyme HPRT, l'hypoxanthine se dégrade en acide urique par la xanthine oxidase, la voie qui produit deux molécules de radicaux libres à partir d'une molécule d'hypoxanthine, (Jiralerspong and Patel 1996). Si l'hypoxanthine est récupérée par l'enzyme HPRT, le produit sera l'inosine monophosphate qui sert comme précurseur à l'adénosine monophosphate (AMP) et à la guanine monophosphate (GMP). Tel que mentionné, l'HPRT est une enzyme d'accompagnement qui récupèrent l'adénine et l'adénine phosphoribosyle transférase pour les convertir directement en AMP. Le cDNA de l'hypoxanthine phosphoribosyle transférase a été originalement isolé par (Konecki et al. 1982). L'ARNm est d'une longueur de 1,292 pb. Il y a 87 paires de base en 5' non codant précédant un cadre de lecture ouverte de 657 pb suivi par 548 pb de séquence non codante en 3' contenant 3 signaux de polyadénylation dont deux sont juxtaposés.

On a déjà signalé le rôle de l'enzyme HPRT dans le contrôle des radicaux libres, dont la double expression chez les embryons bovins femelles peut diminuer le taux des ROS et par la suite ralentir le développement précoce chez les mâles qui avec un taux approprié de radicaux libres entament le stade blastocyste avant les femelles (Gutierrez-Adan et al. 2000).

L'HPRT a beaucoup de relation avec le glucose (Khurana and Wales 1989) entre autres :

- La capacité de l'hypoxanthine d'induire le blocage d'embryons souris au stade deux cellules dépend de la présence de glucose.
- La glucose inhibe partiellement l'activité de l'HPRT, enzyme très importante dans la récupération des purines.
- Une inhibition chimique de l'activité de l'enzyme HPRT induit le blocage au stade deux cellules en présence ou absence de glucose.

En plus, l'inhibition de l'enzyme HPRT par la glucose ou par l'inhibiteur chimique doit certainement entraîner une augmentation du catabolisme de l'hypoxanthine et probablement la production d' $H_2O_2$ . Au niveau des tissus adultes, l' $H_2O_2$  peut stimuler l'augmentation de glucose par la synthèse de glycogène et la gluconéogenèse (O'Brian 1989). Un mécanisme similaire explique que la dégradation de glycogène et le catabolisme du glucose au niveau des embryons souris sont inhibés par une forte concentration d'oxygène (Khurana and Wales 1989). Par conséquent, une augmentation intracellulaire de glucose impliquerait une inhibition de l'enzyme HPRT, résultant en une augmentation du catabolisme d'hypoxanthine et la formation d' $H_2O_2$  qui ensuite stimule l'accumulation de glucose.

Il y a peu d'information concernant la relation entre le métabolisme de la glutamine et les radicaux libres au niveau des embryons. Chez la souris, la glutamine peut exercer partiellement l'effet inverse de l'enzyme HPRT sur le blocage au stade deux cellules (Downs and Dow 1991). De plus, les radicaux libres peuvent imiter l'effet positif de la glutamine (Thompson 1990). L'inhibition de la transamination de la glutamine par le 2-aminoxyacetate entraîne la mort des cellules adrénocorticales bovines en culture. Ces effets toxiques du 2-aminoxyacetate peuvent être amplifiés ou prévenus par l'addition simultanée de faibles concentrations d'antioxydants (Hornsby 1982).

#### **2.6.6 Métabolisme des embryons bovins cultivés *in vitro***

Généralement le potentiel d'énergie métabolique des substrats est alloué à la biosynthèse et autre poste de dépense énergétique via deux processus soit par les

équivalents réducteurs (flavine (FADH<sub>2</sub>), nicotinamide (NADH) et dinucléotide NADPH) sous forme d'ATP. Cependant, une grande quantité d'énergie peut être formée directement par la réaction oxydative (substrat-phosphorylation) qui est contrôlée par des mécanismes de phosphorylation oxydative dans les mitochondries et à la fin les électrons passent à travers la chaîne de transport d'électrons pour réduire la molécule d'oxygène en eau. Le glucose possède 6 molécules de carbone, il occupe une position centrale comme substrat pour la production d'énergie et la synthèse de molécules complexes.

L'importance fonctionnelle du métabolisme du glucose sur le développement embryonnaire *in vitro* chez les bovins (Renard et al. 1980) et la souris est indiquée par une augmentation du taux de glucose après leur transfert au niveau du récipient femelle. Le métabolisme du glucose augmente remarquablement du stade deux cellules jusqu'au stade blastocyste chez la souris (O'Fallon et Wright 1986; Wales et Hunter 1990) alors que chez les bovins il augmente 15 fois via la voie des pentoses phosphate et 30 fois via le métabolisme total entre les stades deux cellules et blastocyste éclos (Rieger et Guay 1988). Cette augmentation chez les embryons bovins, n'est pas linéaire mais graduelle.

Chez les embryons bovins et d'autres mammifères, l'augmentation du métabolisme du glucose coïncide avec le moment de l'activation du génome embryonnaire (Telford et al. 1990). Cependant, la première augmentation du métabolisme du glucose (O'Fallon et Wright 1986; Wales et al. 1987) n'apparaît qu'au stade 8 cellules. Ce retard reflète le blocage de la glycolyse (Brinster 1969) dû à l'inhibition de la phosphofructokinase par le citrate (Barbehenn et al. 1978). De plus, la culture d'embryons *in vitro* en présence de glucose entraîne un clivage précoce des embryons femelles, alors qu'en absence de glucose les embryons mâles clivent plus rapidement (Peippo et al. 2001). Il n'y a pas de différence de nombre entre les deux sexes au stade morula et blastocyste en absence de glucose, mais en présence de glucose plus d'embryons mâles que femelles enrichissent les stades morula et blastocyste.

Chez plusieurs espèces, l'activation du génome embryonnaire est sensible au milieu de culture (blocage du développement) (Rieger et al. 1995). Cependant, ce blocage

embryonnaire semble être relié à une déficience de la transcription du génome embryonnaire et donc à la synthèse protéique (Eyestone et al. 1991) ainsi qu'à certaines conditions métaboliques (Holm et al. 1998).

De plus, il a été montré que le glucose bloque ou a un effet nuisible sur quelques espèces de mammifères comme la souris (Chatot et al. 1989) et les bovins (Ellington 1989). Cet effet est médié par l'effet crabtree où le phosphate inorganique stimule la glycolyse anaérobie et par la suite entraîne une diminution de la phosphorylation oxydative (Schini and Bavister 1988) et de l'ATP intracellulaire.

Le blocage au stade deux cellules des embryons souris est significativement réduit (Downs et Dow 1991) ou éliminé (Ménézo 1990) quand le glucose est remplacé par le fructose. Ceci peut être dû encore à l'effet crabtree (modifications enzymatique qui s'accompagnent d'une inhibition de la voie oxydative ; effet pasteur inverse), car le fructose est aussi métabolisé par la glycolyse anaérobie. D'après ces observations, une hypothèse alternative sur l'effet du glucose est que le contenu de glycogène au niveau des embryons souris augmente par un facteur de 4 entre les stades une et deux cellules (Stern and Biggers 1968). Donc, les embryons cultivés *in vitro* en présence de glucose (Ozias and Stern 1973) contiennent plus de glycogène que ceux développés *in vivo*.

Ces observations suggèrent qu'il est possible que la déficience de glucose-6-phosphate isomérase (enzyme qui convertit le glucose-6-phosphate et fructose-6-phosphate) cause l'accumulation anormale de glycogène au cours du développement précoce chez la souris (Ménézo 1990) et induit parfois un blocage du développement. Le mécanisme par lequel le glycogène est lié au blocage du développement embryonnaire demeure inconnu. Il est possible que l'hydratation anormale d'une grande quantité de glycogène soit la cause du gonflement des blastomères entraînant l'inhibition d'un certain nombre de processus cellulaires (Bavister 1987). Une seconde possibilité réside au niveau de l'effet de l'activité de l'enzyme glycogène synthétase kinase 3 qui joue un rôle important dans la régulation de la synthèse du glycogène (Roach 1990) et au niveau de l'expression d'un ou plusieurs activateurs des proto-oncogènes au cours du développement (Woodgett 1991). Cependant il est admis que l'accumulation de glycogène n'est qu'une coïncidence et l'effet délétère

du glucose est causé par d'autre processus comme la formation des radicaux libres (Rieger 1992b).

Après l'activation du génome embryonnaire, le métabolisme de glucose augmente remarquablement, car il est indispensable pour la suite du développement (Kaye 1986). Cette augmentation reflète sans aucun doute les besoins des processus synthétiques. L'incorporation de glucose dans les glycoprotéines chez la souris (via glucosamine-6-phosphate et N-acetylglucosamine) (Wales et Hunter 1990) change qualitativement et augmente significativement au stade 8 cellules. L'administration de tunicamycine (un antibiotique qui bloque la glycosylation protéique et supprime l'incorporation de glucose dans les glycoprotéines) inhibe totalement la compaction des embryons souris (Surani 1979).

De plus, l'augmentation significative du métabolisme du glucose est accompagnée par la formation et l'expansion de la cavité blastocoelique (Tiffin et al. 1991) comme chez les embryons bovins. Le métabolisme total du glucose double entre les stades morula et blastocyste éclos (Robinson and Benos 1991). Cependant, cette énergie (Rieger and Guay 1988) doit dériver de la glycolyse anaérobie, car la contribution du cycle de Krebs est faible dans le métabolisme de glucose (Rieger and Guay 1988). Le métabolisme de glucose au cours du stade pré-implantation est lié au sexe de l'embryon (Rieger 1992b). Il est donc prévisible que le métabolisme total relatif ainsi que l'activité de la voie des pentoses phosphates, catalysé par le G6PD, soient deux fois plus élevés chez les embryons femelles (Tiffin et al. 1991). Ceci a été prouvé au jour 7 du développement chez les bovins.

En général, le métabolisme total du glucose est significativement plus élevé chez les embryons mâles que les femelles (Avery 1991) et appuie l'observation que les embryons mâles se développent plus rapidement que ceux femelles chez les bovins et la souris.

En dépit de l'effet détriminaire du glucose sur le clivage précoce, la glutamine favorise le développement des embryons souris (Chatot et al. 1989). Chez les embryons bovins produits *in vitro*, le métabolisme de la glutamine augmente relativement du stade deux et quatre cellules et ensuite diminue à un minimum au stade morula et blastocyste, reflétant probablement la dégradation des dérivés maternels enzymatiques et les RNAm ou

bien les deux (Rieger). Entre le stade morula et blastocyste éclos, le métabolisme de la glutamine comme le glucose, augmente significativement chez les embryons bovins *in vivo* ou *in vitro* (Tiffin et al. 1991). Chez la souris, la production *in vivo* de glutamine est de 70% au stade deux cellules, représentant le taux le plus élevé pour ensuite diminuer à 20% au stade 8 cellules et blastocyste (Chatot et al. 1990). Les embryons bovins *in vitro* ont 80% comme niveau le plus élevé au stade deux et quatre cellules et 50% au stade morula (Rieger, D, N.M Loskutoff et K.J. Betteridge, publication non observée). Il est probable que le métabolisme de la glutamine (Newsholme et al. 1985) est une source d'énergie significative au stade précoce du développement embryonnaire, comme le cas chez la souris et favorise, plusieurs proliférations cellulaires rapides, jouant le rôle possible de protection contre les radicaux libres (Thompson 1990).

L'oxygène joue un rôle important dans la régulation de la glycolyse des cellules pourvues de mitochondries. La respiration, en fournissant l'oxygène à la chaîne respiratoire, permet la création d'un gradient chimio-osmotique à travers la membrane interne de la mitochondrie (Iannaccone et al. 1989). Ce gradient favorise l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie où il sera le substrat des enzymes de la glycolyse aérobie dont le rendement permettra un grand gain de glucose et donc le ralentissement de la glycolyse cytoplasmique (effet Pasteur) (Forsberg et al. 1996).

La consommation de glucose nécessaire pour synthétiser 38 molécules d'ATP à partir d'ADP et le phosphate en anaérobiose est de 19 molécules alors que la consommation de glucose pour la même quantité d'ATP en aérobiose est d'une molécule de glucose (Voet 1990). Il ne s'agit pas d'une régulation du métabolisme énergétique au sens propre, car la quantité d'ATP formée est toujours la même et suffisante pour couvrir les besoins de la cellule, mais d'une économie de moyens (consommation de glucose, activité des enzymes de la glycolyse cytoplasmique).

Le blocage au stade deux cellules des embryons souris a été confirmé par l'observation de l'effet contraire quand on ajoute au milieu de culture la superoxyde dismutase ou la forme réduit de glutathion (Noda et al. 1991). La concentration intracellulaire d' $H_2O_2$  est plus élevée au niveau des embryons souris *in vitro* que ceux *in*

*vivo* (Naser-esfahani 1990a). Or, aucune différence dans le blocage ou le déblocage du développement n'a été rapportée chez les différentes espèces. Il est possible que la sensibilité aux radicaux libres soit plus importante que la capacité d'enlever ou d'inhiber leur production (Rieger 1992a).

Une concentration élevée de glucose inhibe le développement chez le rat (De Hertogh et al. 1991; Eriksson and Borg 1991) et induit des malformations chez les embryons au jour 9 qui peuvent être réduites ou éliminées par addition de superoxyde dismutase, catalase ou glutathion peroxydase.

## **2.7 Conclusion de la recension de la littérature**

Les radicaux libres de l'oxygène (ROS) font partie des causes du dimorphisme sexuel de l'embryon mammifère (Voet 1990). Chez ces espèces, les enzymes de détoxification, à savoir la dismutase de superoxyde, préviennent des dommages cellulaires causés par les ROS (Tatemoto et al. 2000). Ces dommages sont le plus souvent observés dans les membranes plasmiques et dans les séquences d'acides nucléiques (Aitken et Fisher 1994). Il est possible que les ROS, dans certaines concentrations, peuvent augmenter le métabolisme global et avoir des effets stimulants sur la croissance. Ainsi, il est facile de voir comment une enzyme qui produit des ROS d'oxygène peut influencer le taux de développement. Peippo et Bredbacka (1995) ont suivi ce raisonnement pour impliquer la glucose-6-phosphate déhydrogénase et l'hypoxanthine phosphoribosyle transférase dans le dimorphisme sexuel des embryons. Une analyse plus introspective du métabolisme et de la protection de ces deux enzymes est nécessaire avant que des conclusions au sujet de leurs effets sur le développement puissent être tirées.



### **3 CHAPITRE : 3. HYPOTHÈSE, OBJECTIFS ET ARTICLE**

#### **3.1 Hypothèse**

Les embryons femelles expriment plus fortement les gènes liés au chromosome X au début du développement embryonnaire.

Comme l'expression élevée des gènes liés au chromosome X semble être impliquée dans la protection contre les radicaux libres, les embryons femelles sont par conséquent plus protégés.

#### **3.2 Objectif**

Vérifier si l'exposition d'embryons bovins au stade morula à un taux élevé d'oxygène cause une surexpression des gènes G6PD et HPRT et favorise le développement des embryons femelles.

### **3.3 Transient Exposure to High Oxygen Concentrations Alters the Sex-Ratio and the Abundance of X-Linked Transcripts in Bovine *In Vitro* Cultured Embryos**

**Saloua Benmouissa, France Filion et Lawrence C Smith**

Centre de recherche en reproduction animale,  
Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal,  
Saint-Hyacinthe, Québec,  
J2S 7C6 Canada

Address for correspondence

Dr. Lawrence C. Smith  
Centre de recherche en reproduction animale,  
Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal,  
3200, Sicotte-CP. 5000  
Saint-Hyacinthe, Québec,  
J2S 7C6 Canada

Phone : (450) 773 8521 (ext. : 18463)

Fax : (450) 778 8103

e-mail : 

### 3.3.1 ABSTRACT

Sexual dimorphism during early developmental rates has been reported in mammalian embryos cultured in artificial environments, suggesting that differences in the expression of X-linked genes during preimplantation development may alter the survival of embryos of different sex. Moreover, compared to the nearly anaerobic conditions *in vivo* uterine environment, embryos cultured *in vitro* are often exposed to elevated oxygen concentrations, which may disturb the energy metabolism and oxidative stress differently in embryos of the opposite sex. Therefore, our goal was to determine if exposure to high oxygen concentrations in culture would alter the sex ratio and its relationship to the expression of X-linked genes. Day-5 morula-stage bovine embryos produced in a 5% O<sub>2</sub> environment were exposed to high oxygen (20% and 40%) for 12 h followed by culture for another 72h at 5% O<sub>2</sub>. Development rates were evaluated and blastocyst-stage embryos were recovered to determine nuclei number, sex ratio, mtDNA copy number, and relative amounts (RA) of two genes located on the X-chromosome, glucose-6-phosphate dehydrogenase (g6pd) and hypoxanthine phosphoribosyl transferase (hppt), and the autosomal housekeeping gapdh gene. Exposure of day-5 morula to elevated O<sub>2</sub> levels did not result in a drop in the quantity (blastocyst percentage) or quality (number of nuclei and mtDNA) of embryos after 72 h. However, sexual dimorphism, which significantly favored males in non-treated controls (2.33:1), was no longer present after transient exposure to 20% (1.27:1) and 40% (1.17:1) O<sub>2</sub> treatments. Moreover, although gapdh transcripts remained stable, both g6pd and hppt transcripts were altered by transient exposure to elevated O<sub>2</sub> levels, suggesting a relationship between the expression of X-linked genes and the sex-specific developmental rate to the blastocyst stage *in vitro*. Results of the present study show for the first time that elevated oxygen shifts in sex ratios and alterations in X-chromosome-linked gene transcript amounts, suggesting a role for oxidative stress in sexual dimorphism of *in vitro*-derived embryos.

Key Words: Oxygen concentrations, sex-ratio, X-linked genes, *in vitro* culture, embryos, bovine.

### 3.3.2 INTRODUCTION

Preimplantation embryos are susceptible to environmental conditions that may affect their future growth and developmental potential (Fernandez-Gonzalez et al. 2004). In some studies a disproportionate number of male versus female calves born from bovine in vitro-cultured (IVC) embryos has been observed (Lechniak et al. 2003). There is also evidence of an association between sex ratio and developmental rates in murine and human embryos (Tsunoda 1985; Pergament et al., 1994). It has also reported that, under some in vitro culture systems, not only bovine male embryos develop faster to the blastocyst stage, but also that a higher percentage of male embryos reach the expanded blastocyst stage (Gutierrez-Adan et al. 2001). This might explain the disproportionate number of males among calves born from in vitro-produced embryos (Kochhar et al. 2001).

The unbalanced expression of X-linked genes between sexes during early preimplantation development, where both X chromosomes are active could explain early developmental differences between male and female embryos (Epstein et al. 1978; Kratzer and Gartler 1978). Studies have shown that the relative abundance of two mRNA for X-linked genes, that are involved in energy metabolism and controlling oxygen radicals (glucose 6-phosphate dehydrogenase-g6pd- and hypoxanthine phosphoribosyl transferase-hprt), are higher in female than in male embryos at the early blastocyst stage in cattle and humans (Gutierrez-Adan et al. 2000; Jimenez et al. 2003; Taylor et al. 2001; Wrenzycki et al. 2002). As a modulator of intracellular redox potential, NADPH is the principal source of reducing power in numerous critical processes, including defense against oxidative stress. NADPH is generated by a variety of reactions; a major part of NADPH requirement is met by the oxidation of glucose-6-phosphate to ribose-5-phosphate and CO<sub>2</sub> in the pentose phosphate pathway (PPP). It has been demonstrated that embryonic cells are able to increase enzyme velocity of the PPP in response to oxidants (Filosa et al. 2003). The first and key PPP regulatory enzyme is g6pd, which has been generally considered essential for providing NADPH-reducing power. hprt is involved in the detoxification of oxygen radicals, but is also a growth stimulant (Rieger 1992).

Sex-related developmental differences during the preimplantation stage seem to be expressed only (or differently) in vitro, indicating that environmental factors can favor

embryos of one or the other sex. The mechanism of post-zygotic sex ratio control in natural populations may offer a physiological explanation, especially if X-linked factors related to energy metabolism cause the differences (Peippo and Bredbacka 1995).

Although it has been suggested that, under some stressful conditions, male embryos are more vulnerable than females, the biological fragility of male embryos is little understood (Perez-Créspeo et al. 2005). Induction of oxidative stress during the preimplantation stages may be the reason for the distortion of sex ratio occurring following the exposure to various toxic and stress-inducing agents (James 1998). The major drawback in the evaluation of sex ratio adjustment in mammals is the lack of knowledge of any physiological mechanism responsible for sex ratio deviation in response to a whole array of environmental and physiological variables (Jimenez et al. 2003).

To date, several parameters have been investigated as potentially predictive indicators of embryo viability in vitro. In assessing the viability of embryos, morphological evaluation has been most widely used non-invasive assessment, but the correlation between the morphological criteria and an embryo's ability to result in an offspring is not high (Butler 1989). Oxygen consumption of an individual embryo was strongly related to its morphological quality (Shiku et al. 2001), cell number and the number of mitochondria (Trimarchi et al. 2000). Mitochondria are known to be strong producers of reactive oxygen species (ROS) and, at the same time, particularly susceptible to the oxidative damage produced by the action of ROS on lipids, proteins and DNA of nuclear and mitochondrial origin (mtDNA).

The level of oxygen utilization by the preimplantation-stage embryo is stage dependent, whereby increased consumption coincides with the initiation of compaction and with blastocyst formation, as these processes are energy demanding (Thompson 1996). When pronucleate mouse oocytes were exposed to 20% oxygen for only 1 h before being cultured in 5% oxygen, there was pronounced inhibition of development compared to similar oocytes that were exposed only to 5% oxygen; (Pabon et al. 1989) however this difference was not manifested until the morulae stage of development. These data indicate that use of 20% oxygen for embryo culture is nonphysiological, so it is not surprising that use of near-atmospheric oxygen damages embryo viability, while not necessarily reducing the ability of embryo to reach the blastocysts stage (Karagenc and Petitte 2000).

Furthermore, it was recently shown that gene expression in bovine blastocysts could be altered by oxygen concentration (Harvey et al. 2004). We hypothesize that exposure of morula-stage embryos to elevated oxygen concentrations could increase the expression of two X-linked genes (G6PD and HPRT), which are involved in protection from free radicals, to a greater extent in female embryos than in males. This should favor the development of female embryos to the blastocyst stage.

### 3.3.3 MATERIALS AND METHODS

#### Embryo Source and Experimental Treatments

Cow ovaries were obtained from a local abattoir, placed in saline at 35°C, and transported to the laboratory within 2 h of slaughter. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from 2- to 8-mm antral follicles using a 19-gauge needle and selected for the presence of several layers of cumulus cells and oocytes with homogenous cytoplasm. Selected COCs were washed in HEPES-buffered tissue culture medium (TCM-199; Invitrogen, Burlington, ON Canada) supplemented with 10% (v:v) fetal calf serum (FCS; Invitrogen). Groups of 20 COCs were matured for 24 h in 100  $\mu$ l drops of TCM-199 supplemented with 10% of FCS (Invitrogen), 1mg/ml estradiol-17 $\beta$  (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 5 mg/ml LH (Ayerst, London, ON, Canada), 0.5 mg/ml FSH (Folltropin-V; Vetrepharm, St. Laurent, PQ, Canada), 11 mg/ml pyruvate (Sigma), and 50 mg/ml gentamicin (Sigma) at 39°C in 5% CO<sub>2</sub>. IVF was performed using the procedures described previously (Parrish 1986). Briefly, expanded COCs were placed in 50  $\mu$ l drops of Tyrode's medium supplemented with 0.6% BSA (fraction V; Sigma), lactate, pyruvate, gentamicin, and 10mg/ml heparin. Frozen-thawed spermatozoa were washed and centrifuged through a gradient of Percoll (Pharmacia, Bromma, Sweden) and diluted at 10<sup>6</sup> live spermatozoa/ml. Fertilization was achieved during a 18 h coincubation under the same temperature and gas conditions as described for maturation. Presumptive zygotes were randomly divided to three groups and cultured for 8 days in 50  $\mu$ l drops modified synthetic oviduct fluid (SOF) (Tervit et al., 1972) containing 8 mg/ml of fat acid free BSA (Sigma) and 1 mM of glutamine. With the exception of a 12 h period on day-5, embryos were cultured in humidified atmosphere of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. During the 12 h treatment period

embryos were cultured either as above (control at 5% O<sub>2</sub>), or at 20% O<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub> in air) or at 40% O<sub>2</sub> (gas mixture with 5% CO<sub>2</sub> and 55% N<sub>2</sub>). All cultures were performed in drops under equilibrated mineral oil at 39 °C.

Development rates to expanded and hatched blastocysts were recorded on day 8 (168 h of culture). Some embryos were fixed in 10% formalin for 10 min, placed onto slides in a mounting solution containing 5 µg ml<sup>-1</sup> of Hoechst 33342, and examined by epifluorescence to determine the number of nuclei per blastocyst. The remaining embryos were exposed to a 1% pronase solution for approximately 3 min to remove the zona pellucida. After removal, zona-free embryos were washed and placed in 5 µl of Ca<sup>++</sup>-free PBS and stored at -70 °C until further analysis.

### **Isolation of mRNA and Genomic DNA**

Messenger RNA was isolated from each individual blastocysts with oligo-dt conjugated beads using Dynabeads mRNA Direct Kit (Dyna, Oslo, Norway) according to the manufacture's protocol with modifications. Briefly, 5 pg rabbit globin mRNA (Sigma, St-Louis, MO) was added to each sample as an external standard. Each embryo was lysed in 100 µl of lysis/binding buffer by gentle vortexing for 10 min and 10 µl of prewashed beads were added into the fluid. After a second gentle vortexing for 10 min, the beads were separated with magnetic separator (Dyna) and the supernatant was used for extraction of genomic DNA. Messenger RNA was eluted from the beads by incubation in 10 µl sterile water at 70 °C for 3 min and reverse transcribed (RT) into cDNA using a Sensiscript RT Kit (Qiagen, Chatworth, CA) according to the manufacture's protocol. Reverse transcriptase was omitted during the RT reaction in the negative controls. The cDNA was purified with 0.8 µg of MS2 carrier RNA (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) using MinElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) according to the manufacture's protocol and eluted with 20 µl of sterile water. Carrier RNA (333 ng, Qiagen) was added to each sample before genomic DNA extraction (QIAmp DNA mini kit, Qiagen), eluted twice with 50 µl of sterile water and diluted 10 times for quantitative PCR. Both cDNA and genomic DNA were used for quantitative PCR on the day of extraction to avoid degradation.

### **Chemicals and Primer Design**

Oligonucleotide primers, Sensiscript kit for reverse transcription and gel extraction kit, were purchased from Qiagen, Inc. (Mississauga, ON, Canada). Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) were purchased from Amersham Biosciences (QC, Canada). All other chemicals and reagents used in this study were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). A PCR kit from Roche Diagnostics (QC, Canada) was used for real time quantitative PCR. Oligonucleotide primer pairs were designed to amplify cDNA of bovine gapdh, g6pd, hpert, Y-chromosome specific, and autosomal-specific genes, based on published sequence information (Table 1). The PCR product of each gene was purified with Cleanup kit (Qiagen) and the resulting DNA samples were sequenced to confirm the specificity of primers.

### **Sex Determination**

Genomic DNA from each embryo was prepared using the Qiam Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and resuspended in 100µl sterile water. 30 µl of the resulting volume was used for PCR. PCR was performed in a final volume of 50 µl of 1x PCR buffer, 200 µM of each dNTP, 0.24 µM of Y-chromosome-specific primer and 0.06 µM of the autosomal-specific primer, and 1 IU Taq DNA polymerase (Amersham). The PCR program employed an initial step of 94°C for 2 min followed by 33 cycles of 25 sec each at 94°C for DNA denaturation, 25 sec at 62°C for annealing of primers, and 30 sec at 72°C for primer extension. The last cycle was followed by a 5-min extension at 72°C and cooling to 4°C. 12 µl of the PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel in 1 x TAE buffer containing 0.5 µg/ml ethidium bromide. The image of each gel was recorded using (Alpha-imager).

### **Determination of Mitochondrial DNA Copy Number**

The LightCycler PCR and detection system (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) was used for amplification and quantification of mtDNA. The LightCycler hot-start PCR was performed in glass capillaries with a LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes kit (Roche Applied Science) as described by the manufacturer. For



quantification of mtDNA we use the same DNA as sexing, PCR was performed in a final volume of 20  $\mu$ l of 10  $\mu$ l of DNA, 1  $\mu$ M of each sequence specific primer 3mM MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l of light Cyler Fast Start Master Sybr Green I (Roche), and 6  $\mu$ l of water. The PCR program employed an initial activation step necessary for enzyme of 95°C for 5 min followed by 40 cycle of 5 sec each at 95°C for denaturation 4 sec at 57°C for annealing of primers, and 9 sec at 72°C for elongation, followed by 1 cycle of melting (95°C/5s, 65°C/5s, 88°C) with temperature transition rate of 0.1°C/s, and finally cooling to 40°C

#### **Determination of the Relative Abundance of G6pd, Hpvt and Gapdh**

The reaction mixture for real time PCR analysis was 4 $\mu$ l of cDNA, 0.5  $\mu$ M of each sequence-specific primer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l of Lightcycler Fast Master SYBR Green I (Roche), and water to a final volume of 20  $\mu$ l. The PCR program employed an initial activation step necessary for enzyme activation of 94°C for 5min followed by 42 cycles of 5 sec each at 94°C for denaturation, 4 sec at 58°C for annealing of primers, and 12 sec at 72°C for elongation, followed by 1 cycle to determine the melting curve (95°C/5s, 65°C/5s, 88°C) with temperature transition rate of 0.1°C/s, and finally cooling to 40°C.

#### **Statistical Analysis**

All values of mtDNA copy number and number of cells were natural log-transformed to reduce variability between samples. The relative abundance (RA) in each replicate were arc-sin transformed and compared by using the Turkey's test following an analysis of variance (ANOVA). Sex ratios were compared with an expected 1:1 ratio by a corrected  $\chi^2$  procedure.

### **3.3.4 RESULTS**

#### **Blastocyst Development and mtDNA replication**

The percentage and quality of blastocysts obtained in culture was assessed to determine the consequence of transient exposure to elevated O<sub>2</sub> on development competence in vitro. The proportion of expanded blastocyst obtained at day 8 of culture did not differ between control and treated embryos exposed to either 20% or 40% O<sub>2</sub> (Figure 1a). Moreover, nuclei number per blastocyst did not differ between control and treated

embryos regardless of O<sub>2</sub> concentration utilized (Figure 1b), indicating that transient exposures to oxygen had no effect on development to the blastocyst stage. A final assessment of embryo quality showed that elevated oxygen had no effect on the ability of embryos to undergo the blastocyst-specific amplification of mtDNA (Figure 1c). Together, these results suggest that day 5 morula-stage embryos exposed for 12 h to elevated oxygen can develop and differentiate normally to the blastocyst stage, and will replicate both nuclear and mtDNA similarly to controls cultured continuously at 5% O<sub>2</sub>.

### **Alteration to the Embryo Sex Ratio**

To test the hypothesis that female embryos are more resistant to oxidative stress, we assessed the change in sex ratio after transient exposure to oxygen (Figure 2). Preliminary experiments had indicated that 14% of the presumptive zygotes were polyspermic in that they contained 3 or more pronuclei (polyspermic) at the 1-cell stage. Since polyspermic embryos would have a higher probability of being diagnosed as males, it is expected that a slightly higher percentage of males embryos would be observed, regardless of culture conditions. At day 5 and day 8 of culture, compacted morula-stage and blastocyst stage embryos cultured at 5% O<sub>2</sub> showed a significant deviation from expected 1:1 male to female ratio (2.34:1,  $P < 0.05$ ), whereas embryos treated at day-5 by transient exposure to 20% (1.3:1,  $P > 0.75$ ) and 40% (1.3:1,  $P > 0.10$ ) oxygen showed reduced dimorphism. Since no net change in blastocyst percentages was attained by treatment (Figure 1a), these results indicate that exposure to oxygen favors the development of day-5 morula-stage female embryos while having a detrimental effect on the development of male morula to the blastocyst stage.

### **Abundance of G6PD, HPRT, and GAPDH Transcripts**

Our next step was to examine the effects of transient exposure to elevated oxygen levels on the amounts of transcripts of X-linked and autosomal genes (Figure 3). Although gapd transcripts were not affected by oxygen, both g6pd and hpert mRNA levels were changed after treatment at 40% oxygen. Interestingly, while g6pd was affected by a loss in dimorphic mRNA levels, hpert transcript levels seemed to increase in male and decrease in female embryos after exposure to oxygen, indicating a shift in the dimorphic expression of

X-linked genes. These results indicate that X-linked genes involved in the protection against free-radical damage may play a role in the sexual dimorphism observed during the generation of embryos in vitro.

### 3.3.5 DISCUSSION:

The concentration of oxygen to which embryos are exposed in vivo varies between 2 and 8% in the oviduct and uterus, depending on the species (Fischer and Bavister 1993). In other words, gametes and embryos are never exposed to atmospheric  $O_2$  (20%) under physiological conditions. Yet, zygotes obtained through in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are routinely cultured in many laboratories at such elevated  $O_2$  concentrations (Mehta 2001; Pool 2002). This clearly makes the embryo vulnerable to possible toxic effects of  $O_2$ , exerted by various reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion radical  $O_2^-$ , hydrogen peroxide  $H_2O_2$  and the hydroxyl radical (OH $\cdot$ ) (Catt and Henman 2000; Guérin 2001). In fact, there is evidence demonstrating that culture at elevated  $O_2$  concentration is associated with a proportional increase in concentration of ROS, such as  $H_2O_2$ , in the embryo (Goto et al. 1993; Kwon et al. 1999), resulting in compromised embryo development. In contrast to these observation, others provided evidence indicating that culture under 5% does not necessarily reduce the production of reactive oxygen species in 2-cell embryos in vitro (Naser-esfahani 1992). At any rate, there is a large amount of data demonstrating that culture of embryos in elevated  $O_2$  concentrations impairs blastocyst development, cell numbers and/or embryo metabolism in a range of species, including the cow, used in the present study as an experimental model (Karagenc et al. 2004). Data gathered in the present study differ from previous reports by showing that elevated oxygen during a 12 h period at day-5 has no effect on the development to the blastocyst stage at day-8. Nonetheless, the transient exposure to elevated  $O_2$  caused a loss in the sex ratio dimorphism, indicating that female embryos are better able to survive oxidative injury compared to males. Indeed, it seems that female embryos accelerate development after exposure to elevated  $O_2$ .

Previous investigators have also noted a higher proportion of males among bovine blastocysts produced in vitro (Yadav et al. 1993). On the other hand, Kawarsky (1999) had demonstrated that exposure of bovine embryos at 72h of IVC to elevated temperature leads

to loss of male embryos by day 9 of embryo development, showing that, in this regard at least, male embryos are more vulnerable to environmental stress.

Even though the exact cause of this phenomenon remains elusive, investigators have noted a sex-dependent difference in growth rate of embryos of a variety of mammals including mice (Burgoyne 1993; Peippo and Bredbacka 1995; Valdivia et al. 1993; Zwingman et al. 1993), humans (Pergament et al. 1994; Ray et al. 1995) sheep (Bernardi and Delouis 1996) and cattle (Avery and Schmidt 1989; Bredbacka and Bredbacka 1996; Callsen 1995; Yadav et al. 1993) suggesting that the mechanisms leading to the preponderance of males over females, may have selective advantages which may explain some problem with in vitro system.

The difference in the growth rates of male and female embryos is thought to be detectable before the major burst of gene activation that occurs at the 8- to 16-cell stage in bovine embryos (Dominko and First 1997; Ray et al. 1995; Yadav et al. 1993). Moreover an excess of males has been found among day 5 embryos and among the embryos that completed their first cell cycle before 30 hpi (Yadav et al. 1993). Lonergan (2000) detected a significantly greater proportion of males among the 2-cell stage bovine embryos but observed no relationship between the time of cleavage (early versus late) and the sex ratio.

In the present study the level of g6pd was significantly higher in female blastocyst stage embryos and it was proportional with ROS level. Although the levels of hprt mRNA were higher in female blastocyst than males, in contrast to g6pd, they did not differ significantly and it was inversely proportional with the level of ROS. The level of g6pd mRNA has been shown to be similar between male and female 2-cell bovine embryos before activation of the embryonic genome (Lonergan et al. 2000), but higher in females than males at the blastocyst stage (Gutierrez-Adan et al. 2000; Lonergan et al. 2000). The levels of hprt mRNA have also been shown to be similar in male and female in vitro produced bovine 2-cell embryos (Lonergan et al. 2000), but in contrast with the present study, have been shown to be significantly higher in female than male blastocyst (Gutierrez-Adan et al. 2000; Lonergan et al. 2000). These observations suggest that the processes of dosage compensation for hprt have occurred by the morula stage, but for g6pd the process was incomplete. Since the inactivation begins at the XIC and spreads along the X chromosome chosen for inactivation (Lyon 1991) those loci such as hprt that are close to

the XIC would show signs of inactivation and dosage compensation earlier than those further away, such as G6pd. The methylation pattern of mouse X chromosome supports this hypothesis of linear spreading of X inactivation from the XIC (Goto 1998)

In the present study, more males were noted among the morulae at day-5 and blastocysts at day-8, regardless of the co-incubation group (20% and 40%) oxygen, although the prevalence of males was significantly higher only in the 5% oxygen co-incubation group. The relatively more advanced stage of development reached by male embryos may reflect the ability of the Y-chromosome-bearing spermatozoa to fertilize the oocytes earlier than their X-chromosome bearing counterparts or the facility of XY zygotes either to initiate or to accelerate, post-fertilization development aided by the expression of sex-specific genes (Yadav et al. 1993).

One possible explanation of the mechanism of this phenomenon we describe is that the differences in transcription of autosomal genes are consequences of differential transcription of X chromosome genes. Female embryos, at least at the blastocyst stage, possess two active X chromosomes in the ICM and could, therefore, be less susceptible to metabolic imbalance as a result of gene dosage (Gutierrez-Adan et al. 2000; Wrenzycki et al. 2002). Genes that are located on the X chromosome, such as encoding *hprt* and *g6pd*, two important components of energetic metabolism that are also involved in controlling the amount of oxygen radicals, for example, were expressed more strongly in female than male morulae and blastocysts (reviewed by Perez-Crespo et al. 2005).

It has been detected that the lower level of oxygen radicals in females (Gutierrez-Adan et al. 2000), due to the double dose of *hprt*, could be responsible of a retarding effect in development; hence males, with appropriated oxygen radicals levels, would form blastocysts earlier than females. These effects could explain why IVC embryos show a significant deviation from 1:1 sex ratio, in culture, they are exposed to environmental conditions (oxygen and light) which facilitate the formation of oxygen radicals. It has been detected that the production of free radicals alone could decrease the fluidity and flexibility of cell membranes (Aitken 1991) and arrest the growth of the embryo at any stage. Gianaroli et al., (1996) have shown that the negative impact of free radicals emanating from prolonged co-incubation of human gametes is manifested on all parameters of IVF. For example, prolonging gamete co-incubation from 1 to 18 h reduced the fertilization rate

from 73 to 66%, cleavage rate from 55 to 39% and pregnancy rate from 28 to 15% in human IVF (Gianaroli et al. 1996). Although in our study transient exposure (12h) at the morulae stage at elevated oxygen 20% and 40% O<sub>2</sub> has no effect on development blastocyst stage, but induced a shift in sex-ratio.

The difference in growth of male and female embryos has been reported in various different ways. Callesen et al. (1995) chose to compare the percentages of bovine embryos developing to the blastocyst stage. This approach has been employed by other groups studying bovine embryos, including Avery et al (1991, 1992) ; Grisart et al. (1995), and in human embryos (Annette 2001; Milki et al. 2002; Pergament et al. 1994).

Related to this study, it has been shown that there is a trend toward faster development of male human embryos from day 2 up to day 5. Consequently, blastocyst transfer tends to inadvertently create a higher number of male offspring. A 1998 study by Quintans, et al., showed a result of 71 percent males born after choosing the most developed blastocysts for transfer.

Our results indicate, for the first time, that a transient exposure to high oxygen (20% and 40%) concentrations in bovine in vitro culture embryos, for a short period (12h) causes an alteration of the sex-ratio and may have implications, especially in the field of human in vitro fertilization, where it is desirable to culture IVF-derived embryos to the blastocyst stage to avoid multiple pregnancies with unaltered live birth sex ratios.

**Table 2. Primers used for PCR and real-time PCR of bovine embryo gene transcripts.**

Genes	Primer sequences and positions	Annealing temperature (°C)	No. cycles	Embryo equivalent	Fragment size (bp)	EMBL accession no.
Globin						
5' (241-260)	GCAGCCACGGTGGCGAGTAT	58	42	(0.2)	257	X04751
3' (555-657)	GTGGGACAGGAGCTTGAAAT					
Gapdh						
5'	GTCAAGGCAGAGAACGGGA	58	42	(0.2)	220	485042
3'	GATGCCCCCATGTTTGTGAT					
HPRT						
5'	TTGCCGACCTGTTGGATTAC	58	42	(0.2)	198	AF176419
3'	TCCCAGTGTCAATTATATCTTC					
G6PD						
5'	TACACCAAGATGATGACCAAG	58	42	(0.2)	226	AJ566767
3'	TTCTCGCGTTCAATGAGGTG					
mtDNA						
5'	AGGAGTACGGCGTAAAACG	58	42	blastocyst	160	V00654
3'	GCATAGTGGGGTATCTAATC					
Y-chromosome specific						
5'	CCTCCCCTTGTTCAAACGCCCGGAATCATT	57	33	blastocyst	210	PCT-WO 86/07095
3'	TGCTTGACTGCAGTGGACCGAGAGGTTTGGG					
Cow specific						
5'	AGGTCGCGAGATTGGTCGCTAGGTCATGCA	57	33	blastocyst	300	PCT-WO 86/07095
3'	AAGACCTCGAGAGACCCTCTTCAACACGT					

## LEGENDS

**Figure 1:** Effects of different concentration 5%, 20%, and 40% oxygen, on bovine embryos *in vitro* a) development to blastocysts, b) number of blastomeres, and c) mtDNA copy number. Bars represent Mean  $\pm$  SEM, a) n = 220; b) n = 20; c) n = 31.

**Figure 2 :** Effects of high concentration of oxygen on the sex-ratio of bovine embryos *in vitro*, (open bars) male embryos, (solids bars) female embryos. Bars with different superscripts within each treatment group differ significantly (a:b;  $P \leq 0.05$ ). n = 31.

**Figure 3 :** Effect of different concentrations of oxygen on the expression pattern a) gapdh, b) g6PD, and c) hpert transcripts, in male (open bars) and female (solid bars) IVP blastocysts. Bars with different superscripts within each treatment group differ significantly (a:b;  $P \leq 0.05$ ). Bars represent Mean  $\pm$  SEM. n= 31.



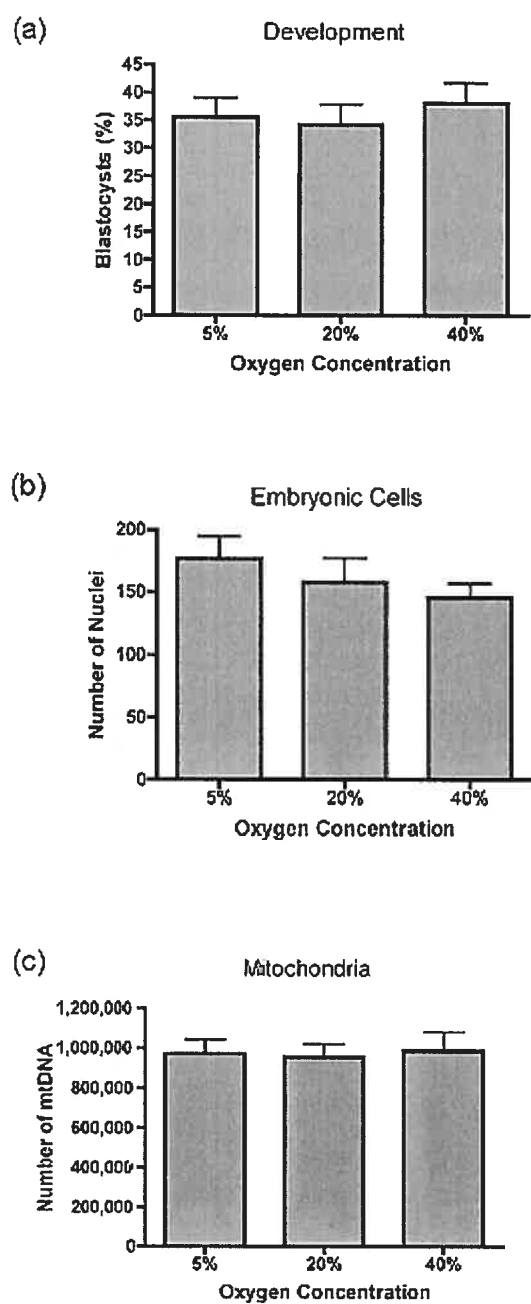
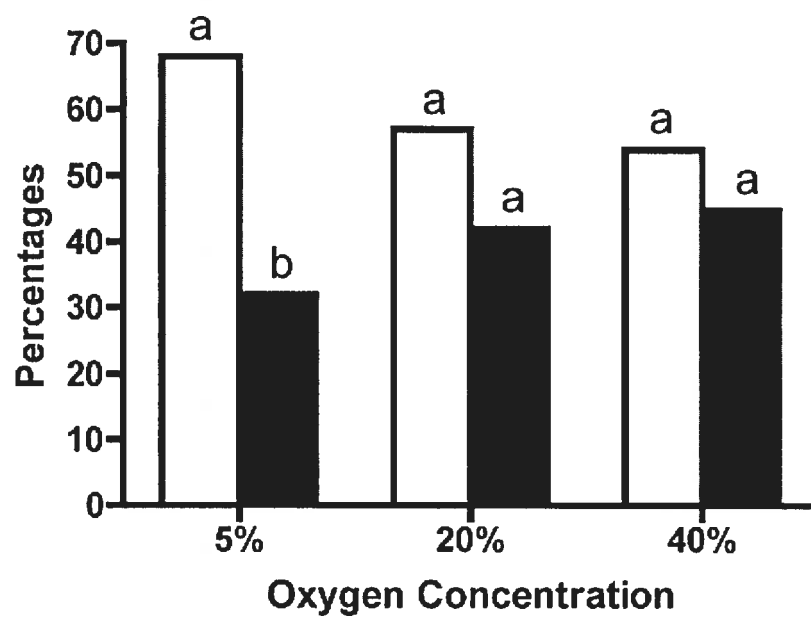
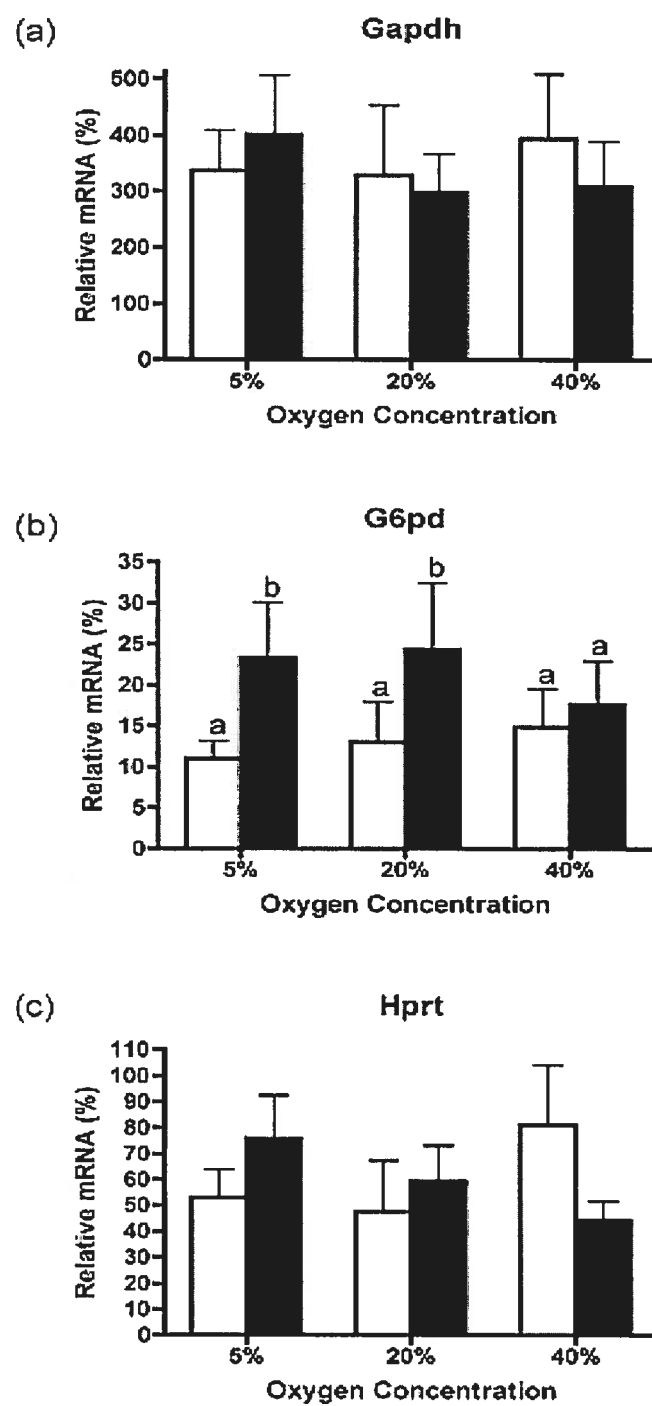
**Fig 1**

Fig 2



**Fig 3**

### 3.3.6 REFERENCES:

- Aitken JR. 1991. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol*: 542-51.
- Annette K. 2001. Sex ratio and birth weights of infants born as a result of blastocyst transfers compared with early cleavage stage embryo transfers. *Fertil Steril* 76:688-693.
- Avery B, Schmidt M. 1989. Sex determination of bovine embryos using H-Y antibodies. *Acta Vet Scand* 30:155-164.
- Bernardi ML, Delouis C. 1996. Sex-related differences in the developmental rate of in-vitro matured/in-vitro fertilized ovine embryos. *Hum Reprod* 11:621-626.
- Bredbacka K, Bredbacka P. 1996. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil* 106:169-172.
- Burgoyne PS. 1993. A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice. *Development* 117:341-345.
- Butler J. 1989. Assessing the viability of preimplantation embryos. *Theriogenology* 31:115.
- Callsen H. 1995. Factors affecting developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim Sci*, 73:1539.
- Catt JW, Henman M. 2000. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod* 15 :199-206.
- Dominko T, First NL. 1997. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 47:456-467.

Epstein CJ, Smith S, Travis B, Tucker G. 1978. Both X chromosomes function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos. *Nature* 274:500-503.

Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, Perez-Crespo M, Ramirez MA, Rodriguez De Fonseca F, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2004. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5880-5885.

Filosa S, Fico A, Paglialunga F, Balestrieri M, Crooke A, Verde P, Abrescia P, Bautista JM, Martini G. 2003. Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem J* 370: 935-943.

Fischer B, Bavister BD. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99: 673-679.

Gianaroli L, Fiorentino A, Magli MC, Ferraretti AP, Montanaro N. 1996. Prolonged sperm-oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate. *Hum Reprod* 11: 2507-2511.

Goto Y. 1998. [Molecular diagnosis of mitochondrial disorders]. *No To Hattatsu* 30: 134-140.

Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med* 15: 69-75.

Guérin P. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen. *Hum. Reprod Up* 7: 175-181.

Gutierrez-Adan A, Granados J, Pintado B, De La Fuente J. 2001. Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. *Reprod Fertil Dev* 13: 361-365.

Gutierrez-Adan A, Oter M, Martinez-Madrid B, Pintado B, De La Fuente J. 2000. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro-produced bovine embryos at the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev* 55: 146-151.

Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG. 2004. Effect of the oxidative phosphorylation uncoupler 2,4-dinitrophenol on hypoxia-inducible factor-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Reprod Fertil Dev* 16: 665-673.

James WH. 1998. Hypotheses on mammalian sex ratio variation at birth. *J Theor Biol* 192: 113-116.

Jimenez A, Madrid-Bury N, Fernandez R, Perez-Garnelo S, Moreira P, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2003. Hyperglycemia-induced apoptosis affects sex ratio of bovine and murine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 65: 180-187.

Karagenc L, Petite JN. 2000. Soluble factors and the emergence of chick primordial germ cells in vitro. *Poult Sci* 79: 80-85.

Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahceci M. 2004. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod Biomed Online* 9: 409-417.

Kawarsky SJ. 1999. Effects of elevated temperature on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. PhDthesis, University of Guelph, Guelph, Ont, Canada.

Kochhar HP, Peippo J, King WA. 2001. Sex related embryo development. *Theriogenology* 55: 3-14.

- Kratzer PG, Gartler SM. 1978. HGPRT activity changes in preimplantation mouse embryos. *Nature* 274: 503-504.
- Kwon HC, Yang HW, Hwang KJ, Yoo JH, Kim MS, Lee CH, Ryu HS, Oh KS. 1999. Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. *J Obstet Gynaecol Res* 25: 359-366.
- Lechniak D, Strabel T, Bousquet D, King AW. 2003. Sperm pre-incubation prior to insemination affects the sex ratio of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim* 38: 224-227.
- Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, Fuente JD, Boland M. 2000. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 57: 146-152.
- Lyon MF. 1991. The quest for the X-inactivation centre. *Trends Genet* 7: 69-70.
- Mehta RH. 2001. Growth of human preimplantation embryos in vitro. *Reprod Biomed Online* 2: 113-119.
- Milki AA, Hinckley MD, Gebhardt J, Dasig D, Westphal LM, Behr B. 2002. Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos. *Fertil Steril* 77: 1191-1195.
- Naser-esfahani MH. 1992. Effects of glucose, glutamine ethylen. *J Reprod Fertil* 96: 219-223.
- Pabon JE, Jr., Findley WE, Gibbons WE. 1989. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 51: 896-900.

Parrish JJ. 1986. Bovine in vitro fertilisation with frozenthawed semen. *Theriogenology*. 25: 591-599.

Peippo J, Bredbacka P. 1995. Sex-related growth rate differences in mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev* 40: 56-61.

Perez-Crespo M, Ramirez MA, Fernandez-Gonzalez R, Rizos D, Lonergan P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2005. Differential sensitivity of male and female mouse embryos to oxidative induced heat-stress is mediated by glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression. *Mol Reprod Dev* 72: 502-510.

Pergament E, Fiddler M, Cho N, Johnson D, Holmgren WJ. 1994. Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum Reprod* 9: 1730-1732.

Pool TB. 2002. Recent advances in the production of viable human embryos in vitro. *Reprod Biomed Online* 4: 294-302.

Ray PF, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH. 1995. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 104: 165-171.

Rieger D. 1992. Relationships Between Energy Metabolism. *Theriogenology* 37:75-80.

Shiku H, Shiraishi T, Ohya H, Matsue T, Abe H, Hoshi H, Kobayashi M. 2001. Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem* 73: 3751-3758.

Taylor DM, Handyside AH, Ray PF, Dibb NJ, Winston RM, Ao A. 2001. Quantitative measurement of transcript levels throughout human preimplantation development: analysis of hypoxanthine phosphoribosyl transferase. *Mol Hum Reprod* 7:147-154.



Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL. 2000. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 62: 1866-1874.

Tsunoda Y. 1985. Altered sex ratio of live young. *Gam Res* 12:301-310.

Valdivia RP, Kunieda T, Azuma S, Toyoda Y. 1993. PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured in vitro. *Mol Reprod Dev* 35: 121-126.

Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. 2002. In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 66: 127-134.

Yadav BR, King WA, Betteridge KJ. 1993. Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated in vitro. *Mol Reprod Dev* 36: 434-439.

Zwingman T, Erickson RP, Boyer T, Ao A. 1993. Transcription of the sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 814-817.

## 4. CHAPITRE 4. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION GÉNÉRALE :

### 4.1 DISCUSSION GÉNÉRALE

La concentration de l'O<sub>2</sub> pour laquelle les embryons mammifères sont exposés *in vivo* varie entre 2 et 8% au niveau de l'oviducte et l'utérus, selon les espèces (Fischer and Bavister 1993). En d'autres termes, les gamètes et les embryons ne sont jamais exposés à une concentration d'O<sub>2</sub> atmosphérique (20%) dans des conditions physiologiques. Cependant, des zygotes obtenus par l'insémination ou l'injection intracytoplasmique de sperme (ICSI) sont cultivés dans beaucoup de laboratoires de FIV à des concentrations élevées d'O<sub>2</sub> (Mehta 2001; Pool 2002). Ceci rend clairement l'embryon vulnérable aux effets toxiques possibles de l'O<sub>2</sub>, exercés par plusieurs espèces des radicaux libres d'O<sub>2</sub> (ROS), par exemple le radical anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>, le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le radical hydroxyle OH (Catt and Henman 2000; Guérin 2001a). En fait, il est évident que la culture d'embryons à une concentration élevée d'O<sub>2</sub> est associée à une augmentation proportionnelle du taux des ROS, tel que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, au niveau de l'embryon (Goto et al. 1993; Kwon et al. 1999), ayant pour résultat l'altération du développement embryonnaire.

Plusieurs études, ont démontré un plus grand pourcentage des embryons mâles au stade blastocyste chez les bovins en culture *in vitro*. D'autres part Kawarsky (1999) avait démontré que l'exposition des embryons bovins à une forte température pendant 72h conduit à une perte des embryons mâles au jour 9 du développement, ce qui explique que les embryons mâles sont plus vulnérables au changement des conditions externes que les femelles. Quoique le problème demeure évasif, d'autres découvertes montrent que le sexe-ratio chez beaucoup d'espèces mammifères reste toujours plus élevé chez les mâles, comprenant la souris (Burgoyne 1993; Peippo et Bredbacka 1995; Valdivia et al. 1993; Zwingman et al. 1993), les humains (Pergament et al. 1994; Ray et al. 1995) et les bovins (Avery et Schmidt 1989; Bredbacka et Bredbacka 1996; Callsen 1995; Yadav et al. 1993) suggérant que les mécanismes sélectifs menant à la prépondérance des embryons mâles sur les embryons femelles, ne peuvent être surmontés au système de culture *in vitro*.

Contrairement à ces observations, Naser-esfahani (1992) démontre que la culture *in vitro* à un taux de 5% d'O<sub>2</sub> ne réduit pas nécessairement la production des radicaux libres

au niveau des embryons au stade deux-cellules. En général, plusieurs données démontrent que la culture des embryons *in vitro* à des concentrations élevées d'O<sub>2</sub> altère le développement au stade blastocyste, le nombre de cellules et/ou le métabolisme de l'embryon, ainsi que l'expression des gènes chez plusieurs espèces, y compris les bovins utilisés dans la présente étude en tant que modèle expérimental (révisé par Karagenc et al. 2004).

Il est connu que l'impact de l'oxygène sur les embryons peut dépendre de la présence des contaminants cellulaires en culture capable de générer des ROS et aussi la présence des anti-oxydants chélateur dans le milieu de culture au moment de la manipulation des embryons (Bing et al. 2003). Dans ce contexte, on peut noter que la composition exacte des milieux de culture n'est pas tout à fait connue comme SOF et TCM-199.

Dans l'étude de Peippo et al.(2002), il démontre que la transcription de G6PD, et de HPRT ont été détectée chez les embryons bovins à tous les stades du développement analysé. Puisque la méthode de RT-PCR employée ne peut pas distinguer les transcriptions maternelles, de même que ceux dérivées de l'embryon, on ne pourrait pas déterminer quand la transcription de G6PD, HPRT du génome embryonnaire se produit. Afin de pouvoir distinguer entre les transcriptions d'origine maternelle, (i.e. : ovocyte-dérivé) et embryonnaire, des séquences programmées de polymorphisme identifié, par exemple, des ribonucléases de restriction) sont nécessaires (Taylor et al. 1997).

Or le niveau de G6PD était significativement plus élevé chez les femelles que les embryons mâles à 5 et à 20% de l'oxygène, mais les niveaux de HPRT étaient semblables dans les deux sexes. On s'attend à ce que l'expression de XIST chez les embryons femelles soit en parallèle avec le déclenchement de la compensation de dosage, comme le niveau de l'expression de G6PD et HPRT, qui est sujet à la compensation de dosage, ne devrait pas être différent entre les sexes quand l'expression de XIST est détectée au niveau des embryons femelles. Cependant, puisque l'inactivation de X est répartie au niveau de plusieurs parties du cycle cellulaire (De La Fuente et al. 1999) et se produit à différentes heures dans différentes lignées cellulaires (Monk and Harper 1979), on s'attend à ce que la

balance des niveaux de transcription se produise graduellement. En outre, cette pondération entre les deux sexes peut être ralentie par l'augmentation globale du nombre de cellules du stade morula au blastocyste, lesquelles sont plus élevées chez les embryons mâles comparé aux embryons femelles *in vitro* (Ray et al. 1995; Yadav et al. 1993). Néanmoins, on s'attend à ce que les différences des niveaux d'expression entre les mâles et les femelles diminuent au fur et à mesure que le développement progresse.

Cependant, les résultats de notre étude sont différents de ceux précédents en ce qui concerne l'expression de ces gènes au stade blastocyste. Par exemple, des niveaux des transcriptions du gène HPRT ont été détectés au stade blastocyste 2 ou 3 jours après que l'expression de XIST a été détectée (Peippo et al. 2002) et 1 ou 2 jours avant que le où la réplique du chromosome X inactif a été ultérieurement détectée (De La Fuente et al. 1999). Au contraire, les niveaux des transcriptions du G6PD étaient significativement plus élevés chez les embryons femelles au stade blastocyste que ceux mâles à la concentration d'O<sub>2</sub> 5% et 20%

Dans la présente étude le niveau de G6PD est significativement plus élevé chez les embryons femelles au stade blastocyste. Bien que les niveaux de HPRT aient été plus élevés au stade blastocyste femelle que ceux mâles, contrairement aux niveaux de G6PD, ils ne diffèrent pas d'une manière significative. Le niveau l'ARNm de G6PD s'est avéré semblable entre les embryons mâles et femelles chez les bovins au stade 2-cellule avant l'activation du génome embryonnaire (Lonergan et al. 2000), mais plus élevé chez les femelles que les mâles au stade blastocyste (Gutierrez-Adan et al. 2000; Lonergan et al. 2000) Le niveau du l'ARNm de HPRT également s'est avéré semblable chez les mâles et les femelles des embryons bovins au stade deux cellule (Lonergan et al. 2000), mais contrairement à notre étude, il s'est avéré significativement plus haut chez les femelles que les blastocystes mâles (Gutierrez-Adan et al. 2000; Lonergan et al. 2000). Ces observations pourraient suggérer que le processus de la compensation du dosage pour le gène HPRT a eu lieu au stade morula, alors que pour le gène G6PD le processus d'inactivation du chromosome X est inachevé. La présence de XIST au stade deux cellules chez les embryons bovins (Wrenzycki et al. 2002) suggérerait que l'inactivation du chromosome X

ait commencé. Puisque l'inactivation commence au CIX (centre d'inactivation du chromosome X) et se propage tout le long des gènes du chromosome X choisi pour l'inactivation (Lyon 1991) tel que HPRT qui est près du CIX, et montre des signes de compensation d'inactivation et de dosage plus tôt que les gènes situés loin du CIX, tel que G6PD. Le modèle de méthylation du chromosome X chez la souris soutient cette hypothèse de propagation linéaire de l'inactivation de X du CIX (Goto 1998).

Il a été découvert que l'inhibition du gène G6PD diminue les divergences entre les embryons mâles et femelles pendant le développement embryonnaire précoce (Pérez-Crespo 2005). Ce qui est en accord avec Kimura et al. (2004), que l'inhibition de G6PD chez les embryons bovins élimine les différences d'expression d'ARNm d'interféron-tau entre les mâles et les femelles. Ceci explique que le gène G6PD induit d'autres différences physiologiques. Une possibilité pour expliquer ce phénomène, que certains facteurs de transcription responsable des différentes régulations du potentiel d'oxydo/réduction entre les mâles et les femelles sont plus actifs quand la concentration du NADPH est élevée. Le rôle antioxydants de NADPH peut être considéré en terme de chélateur des radicaux et régulateur du potentiel d'oxydo/réduction (Harvey et al. 2002). En terme de chélateur des ROS, sous les conditions normales de culture, les embryons mâles possèdent plus d' $\text{H}_2\text{O}_2$  que les femelles; donc une faible dose d' $\text{H}_2\text{O}_2$  favorise la prolifération cellulaire chez les mâles, mais sous certaines conditions de stress, la forte dose d' $\text{H}_2\text{O}_2$  entraîne une incidence de mort cellulaire chez les mâles via l'apoptose ou par des mécanismes nécrotiques (Hansen et al. 1999). Les intervalles entre l'augmentation de divisions cellulaires, la vulnérabilité des cellules aux agents toxiques, ainsi que la vitesse rapide de division chez les mâles, augmentent la susceptibilité aux changements environnementaux, et bien entendu affecte le sex-ratio. En terme de régulateur de potentiel d'oxydo/réduction, l'altération de ce dernier peut activer l'induction des facteurs hypoxie, qui peuvent médier l'expression de certains gènes impliqués dans les processus cellulaires et systémiques, ceci dit dépendamment de l'oxygène (Harvey et al. 2002).

Les résultats de Jimenez et al. (2003) concordent avec, car ils ont trouvé que les niveaux d'expression des gènes cibles sont plus élevés chez les embryons femelles comparé

aux mâles, mais ce niveau d'expression ne double jamais, peut-être parce qu'une partie du blastocyste précoce a déjà un chromosome X inactif. Ces résultats sont conformes aussi aux différences observées pour l'expression des transcrits de G6PD et de HPRT (Gutierrez-Adan et al. 2000) et confirment que les différenciations sexuelles se passent avant la différenciation des gonades, et que les embryons bovins préimplantation ont une expression sexuellement divergente des transcrits de certains gènes comme le G6PD et le HPRT. Le taux de glucose en culture *in vitro* affectent différemment les embryons mâles et femelles de préimplantation et entraîne un dimorphisme du sex-ratio par exemple à une concentration de glucose de 5mM; les embryons sont affectés par des radicaux libres d'oxygène dus à une activité glycolytique, produit une perte préférentielle d'embryons femelles et à des niveaux élevés du glucose 20mM; l'expression des transporteurs de glucose diminue et mène à une baisse dans les niveaux libres intra-embryonnaires de glucose dans les blastocystes induisant la mort de cellules par apoptose et une perte préférentielle d'embryons mâles.

Il est clair que la difformité du sex-ratio des embryons bovins produits *in vitro*, ne se produit pas *in vivo*. Le mécanisme qui explique ce déséquilibre dans le rapport entre les mâles et les femelles n'est pas totalement compris (Tshimangadzo 2004). En plus il a été montré que le glucose et la concentration d'oxygène sont liés au sex-ratio pendant le développement chez les embryons bovins (Bredbacka and Bredbacka 1996). Plusieurs embryons mâles enrichissent le stade blastocyte et en plus possèdent un grand nombre de cellules (Catt 1997; Xu et al. 1992). Au contraire dans l'étude de Beyhan et al. (1999), les embryons mâles et femelles possèdent le même nombre de cellules au jour 8 du développement. Le nombre de cellules a été longtemps un indicateur relié à la qualité de stade blastocyste (van Soom et al. 1997). En revanche dans notre étude on a comparé le nombre de cellules ainsi que la morphologie, par rapport aux différentes concentrations d'oxygène, dont les résultats montrent qu'il n'a pas d'effet sur le nombre de cellules.

Il est évident que le patron d'inactivation du chromosome X individuel avec la translocation des autosomes n'est pas dû au hasard (Summitt et al. 1978). Ceci confirme l'importance de notre présente étude, que la culture *in vitro* des embryons bovins à des

concentrations élevées d'oxygène (20% et 40%) affecte le développement et spécifiquement une action directe sur l'AR des gènes liés au chromosome X comme G6PD et HPRT.

## 4.2 CONCLUSION

Récemment, il a été trouvé qu'il existe un patron d'expression aberrant au niveau des embryons dérivés par les systèmes de FIV, plus spécifiquement les gènes impliqués dans l'adaptation au stress oxydatif, la fonction trophoblastique, et la méthylation d'ADN (Wrenzycki et al. 2001). A la lumière de nos résultats, on démontre qu'il existe une expression dimorphique de certains gènes (G6PD et HPRT) liés au chromosome X, durant le développement *in vitro* des embryons bovins au stade blastocyste en relation avec la consommation d'oxygène. Ainsi cette étude, ajoute une nouvelle information aux études précédentes révisées par Wrenzycki et al. (2002), par la découverte que la production *in vitro* (PIV) affecte la compensation des gènes liés au chromosome X chez les embryons mâles et femelles. Ce qui suggère que la pondération des niveaux d'ARNm détectés au niveau des mâles et les femelles peut être influencée par d'autres facteurs qui ne sont pas nécessairement liés à l'inactivation de l'un des deux chromosomes X des embryons femelles.

Donc le problème majeur de la production d'embryons *in vitro* chez les mammifères, est que les embryons mâles arrivent plus rapidement au stade blastocyste et sont de qualité supérieure aux femelles, ce qui cause bien des soucis pour la production d'embryons. Aujourd'hui, le diagnostic du sexe de l'embryon est très peu utilisé dans les schémas d'amélioration génétique. Le coût du veau produit reste dissuasif, et le fait que seulement 60 % des embryons jugés aptes à la transplantation puissent être "sexés" constitue une perte économique non négligeable. En race Holstein par exemple, dans laquelle 30 % environ des taureaux sont issus d'embryons importés (congelés mais non sexés) les sélectionneurs préfèrent utiliser tous les embryons, les jeunes mâles étant mis en testage et les femelles superovulées. Le recours au diagnostic de sexe des embryons permettrait toutefois de valoriser d'autres biotechnologies comme le clonage de l'embryon. En plus, il a été démontré par plusieurs chercheurs, que le transfert embryonnaire au stade blastocyste chez l'humain amène un dimorphisme du sexe ratio (Annette 2001; Milki et al. 2002; Pergament et al. 1994)



Dans la lumière de nos résultats qui indiquent qu'une exposition transitoire des embryons bovins en CIV au stade morula à des concentrations d'oxygène élevé (20% et 40%) pendant une courte période (12h), cause une altération du sexe-ratio en faveur des embryons femelles. Ceci peut avoir des implications, particulièrement dans le domaine de la fertilisation *in vitro* chez les humains, où il est souhaitable de cultiver les embryons jusqu'au stade blastocyste et arriver à un taux de sexe-ratio proche de 1 :1.

## 5. CHAPITRE 5. BIBLIOGRAPHIE

Agulnik AI, Mitchell MJ, Mattei MG, Borsani G, Avner PA, Lerner JL, Bishop CE. 1994. A novel X gene with a widely transcribed Y-linked homologue escapes X-inactivation in mouse and human. *Hum Mol Genet* 3 :879-884.

Aitken J, Fisher H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16: 259-267.

Alexiou M, Leese HJ. 1992. Purine utilisation, de novo synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos. *Development* 114: 185-192.

Alvarez JG, Minaretzis D, Barrett CB, Mortola JF, Thompson IE. 1996. The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 65: 400-405.

Alvarez JG, Storey BT. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42: 334-346.

Annette K. 2001. Sex ratio and birth weights of infants born as a result of blastocyst transfers compared with early cleavage stage embryo transfers. *Fertil Steril* 76: 688-693.

Ashworth A, Rastan S, Lovell-Badge R, Kay G. 1991. X-chromosome inactivation may explain the difference in viability of XO humans and mice. *Nature* 351: 406-408.

Avery B. 1991. Sex and development in bovine in vitro fertilized embryos. *Theriogenology* 35: 953-963.

Avery B, Schmidt M. 1989. Sex determination of bovine embryos using H-Y antibodies. *Acta Vet Scand* 30: 155-164.

Barbehenn EK, Wales RG, Lowry OH. 1978. Measurement of metabolites in single preimplantation embryos; a new means to study metabolic control in early embryos. *J Embryol Exp Morphol* 43: 29-46.

Basrur PK, Farazmand A, Stranzinger G, Graphodatskaya D, Reyes ER, King WA. 2004. Expression pattern of X-linked genes in sex chromosome aneuploid bovine cells. *Chromosome Res* 12: 263-273.

Bavister BD. 1987. Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. plenum publishing: 219.

Beyhan Z, Johnson LA, First NL. 1999. Sexual dimorphism in IVM-IVF bovine embryos produced from X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 52: 35-48.

Bielski BHJ. 1983. A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 258:4759-61.

Bing YZ, Hirao Y, Takenouchi N, Che LM, Nakamura H, Yodoi J, Nagai T. 2003. Effects of thioredoxin on the preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 59: 863-873.

Blondin P, Coenen K, Sirard MA. 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 18: 454-460.

Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, Allis CD. 2002. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet* 30: 73-76.

Bredbacka K, Bredbacka P. 1996. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil* 106: 169-172.

Brinster RL. 1969. Incorporation of carbon from glucose and pyruvate into the preimplantation mouse embryo. *Exp Cell Res* 58: 153-158.

Burgoyne PS. 1993. A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice. *Development* 117: 341-345.

Callsen H. 1995. Factors affecting developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim Sci*, 73:1539-43.

Carrel L, Willard HF. 1999. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7364-7369.

Catt JW, Henman M. 2000. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod* 15 Suppl 2: 199-206.

Chatot CL, Tasca RJ, Ziomek CA. 1990. Glutamine uptake and utilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium. *J Reprod Fertil* 89: 335-346.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 86: 679-688.

De Hertogh R, Vanderheyden I, Pampfer S, Robin D, Dufrasne E, Delcourt J. 1991. Stimulatory and inhibitory effects of glucose and insulin on rat blastocyst development in vitro. *Diabetes* 40: 641-647.

De La Fuente R, Hahnel A, Basrur PK, King WA. 1999. X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. *Biol Reprod* 60: 769-775.

Disteche CM. 1995. Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends Genet* 11: 17-22.

Downs SM, Dow MP. 1991. Hypoxanthine-maintained two-cell block in mouse embryos: dependence on glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors. *Biol Reprod* 44: 1025-1039.

Ellington JE. 1989. Comparaison of media in an early bovine embryos. *Theriogenology* 31:189-195.

Eriksson UJ, Borg LA. 1991. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia* 34: 325-331.

Eyestone WH. 1987. Culture of bovine one and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology* 28:1-10.

Eyestone WH, Jones JM, First NL. 1991. Some factors affecting the efficacy of oviduct tissue-conditioned medium for the culture of early bovine embryos. *J Reprod Fertil* 92: 59-64.

Filler R, Lew KJ. 1981. Developmental onset of mixed-function oxidase activity in preimplantation mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 6991-6995.

Fischer B, Bavister BD. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99: 673-679.

Forsberg H, Borg LA, Cagliero E, Eriksson UJ. 1996. Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment. *Free Radic Res* 24: 451-459.

Galli C. 1994. Large scale production of bovine embryos. *Breeding Kraków, Poland*,:111.

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341-1357.

Galli C, Moor RM. 1991. Development of immature bovine oocytes into viable embryos in vitro. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 75: 67-71.

Galli CaL, G. (1996) 42: 371-379. 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reprod Sci* 42: 371.

Gilbert SL, Sharp PA. 1999. Promoter-specific hypoacetylation of X-inactivated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13825-13830.

Goodfellow PJ, Mondello C, Darling SM, Pym B, Little P, Goodfellow PN. 1988. Absence of methylation of a CpG-rich region at the 5' end of the MIC2 gene on the active X, the inactive X, and the Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5605-5609.

Gorry P, Lufkin T, Dierich A, Rochette-Egly C, Decimo D, Dolle P, Mark M, Durand B, Chambon P. 1994. The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9032-9036.

Goto Y. 1998. [Molecular diagnosis of mitochondrial disorders]. *No To Hattatsu* 30: 134-140.

Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. 1993. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med* 15: 69-75.

Greenfield A, Carrel L, Pennisi D, Philippe C, Quaderi N, Siggers P, Steiner K, Tam PP, Monaco AP, Willard HF, Koopman P. 1998. The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. *Hum Mol Genet* 7: 737-742.

Greve T, Callesen H. 2005. Embryo technology: implications for fertility in cattle. *Rev Sci Tech* 24: 405-412.

Guérin P. 2001a. Oxidative stress and protection against reactive oxygen. *Hum Reprod Update* 7: 175-189.

Gutierrez-Adan A, Granados J, Pintado B, De La Fuente J. 2001. Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured in vitro. *Reprod Fertil Dev* 13: 361-365.

Gutierrez-Adan A, Maga EA, Meade H, Shoemaker CF, Medrano JF, Anderson GB, Murray JD. 1996. Alterations of the physical characteristics of milk from transgenic mice producing bovine kappa-casein. *J Dairy Sci* 79: 791-799.

Gutierrez-Adan A, Oter M, Martinez-Madrid B, Pintado B, De La Fuente J. 2000. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro-produced bovine embryos at the blastocyst stage. *Mol Reprod Dev* 55: 146-151.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C (1989). The chemistry of oxygen radicals and other derived species. *free radicals in biology and medicine*:22-85.

Hansen D, Moller H, Olsen J. 1999. Severe periconceptional life events and the sex ratio in offspring: follow up study based on five national registers. *Bmj* 319: 548-549.

Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG. 2002. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction* 123: 479-486.

Heard E, Clerc P, Avner P. 1997. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet* 31: 571-610.

Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H. 1998. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology* 50: 1285-1299.

Hornsby PJ. 1982. The role of vitamin E in cellular energy metabolism in cultured adrenocortical cells. *J Cell Physiol* 112: 207-216.

Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ. 1996. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 44: 476-485.

Hyslop PA. 1988. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP. *J Biol Chem* 263:1665-1671.

Iannaccone PM, Berkwits L, Joglar J, Lindsay J, Lunde A. 1989. Probabilistic division systems modeling the generation of mosaic fields. *J Theor Biol* 141: 363-377.

Jimenez A, Madrid-Bury N, Fernandez R, Perez-Garnelo S, Moreira P, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2003. Hyperglycemia-induced apoptosis affects sex ratio of bovine and murine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 65: 180-187.

Jiralerspong S, Patel PI. 1996. Regulation of the hypoxanthine phosphoribosyl transferase gene: in vitro and in vivo approaches. *Proc Soc Exp Biol Med* 212: 116-127.

Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. 1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays* 16: 31-38.

Jones DP. 1985. The role of oxygen concentration in oxidative stress. Academic Press, london:151.

Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahceci M. 2004. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reprod Biomed Online* 9: 409-417.

Kawarsky SJ. 1999. Effects of elevated temperature on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. PhD thesis, University of Guelph, Guelph, Ont, Canada.

kaye PL. 1986. Metabolic aspects of the physiology of the preimplantation. Press cambridge: 267.

Khurana NK, Wales RG. 1989. Effects of oxygen concentration on the metabolism of [U-14C]glucose by mouse morulae and early blastocysts in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1: 99-106.



Kimura K, Spate LD, Green MP, Murphy CN, Seidel GE, Jr., Roberts RM. 2004. Sexual dimorphism in interferon-tau production by in vivo-derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 67: 193-199.

Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. 1994. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *Faseb J* 8: 174-181.

Konecki DS, Brennand J, Fuscoe JC, Caskey CT, Chinault AC. 1982. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase genes of mouse and Chinese hamster: construction and sequence analysis of cDNA recombinants. *Nucleic Acids Res* 10: 6763-6775.

Kwon HC, Yang HW, Hwang KJ, Yoo JH, Kim MS, Lee CH, Ryu HS, Oh KS. 1999. Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. *J Obstet Gynaecol Res* 25: 359-366.

Larson MA, Kimura K, Kubisch HM, Roberts RM. 2001. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9677-9682.

Lazzari G. 1993. Salvage of valuable germplasm of sterile cattle by in vitro technologies. 9<sup>e</sup> Réunion Association Européenne de Transfert Embryonnaire:87.

Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65: 137-152.

Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Fair T, Ward F, Fuente JD, Boland M. 2000. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 57: 146-152.

Loustradis D. 1987. Hypoxanthine causes 2 cell block in random-bred mouse embryos in vitro. *Biol Reprod* 37: 311-316.

Lyon MF. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190: 372-373.

Lyon MF. 1991. The quest for the X-inactivation centre. *Trends Genet* 7: 69-70.

Machaty Z. 2000. Inhibition of oxidative phosphorylation and its effect. *Theriogenology* 53:277-283.

Manes C, Lai NC. 1995. Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J Reprod Fertil* 104: 69-75.

Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, Luzzatto L, Dono R, Viglietto G, Paonessa G, D'Urso M, Persico MG. 1986. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Embo J* 5: 1849-1855.

Mass DHA. 1976. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey. *Fertil Steril* 27:1312-7.

Mastroianni L, Jr., Jones R. 1965. Oxygen Tension within the Rabbit Fallopian Tube. *J Reprod Fertil* 147: 99-102.

Mehta RH. 2001. Growth of human preimplantation embryos in vitro. *Reprod Biomed Online* 2: 113-119.

Milki AA, Hinckley MD, Gebhardt J, Dasig D, Westphal LM, Behr B. 2002. Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos. *Fertil Steril* 77: 1191-1195.

Monk M, Harper MI. 1979. Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. *Nature* 281: 311-313.

- Munné S. 1991. Superoxide anion increases after sperm storage. *Biol Reprod* 44: 681-688.
- Naser-esfahani MH. 1990a. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early development. *Development* 109: 501-507.
- Naser-esfahani MH. 1992. Effects of glucose, glutamine ethylen. *J Reprod Fertil* 96:219-222.
- Nasr-Esfahani MM, Johnson MH. 1991. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. *Development* 113: 551-560.
- Newsholme EA, Crabtree B, Ardawi MS. 1985. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci Rep* 5: 393-400.
- Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. 1991. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Mol Reprod Dev* 28: 356-360.
- Nouredin A, Epsaro.E, Kiessling AA. 1990. Purines inhibit the development of mouse. *J Reprod Fertil* 90:455-64.
- O'brian PJ. 1989. Physiological function and role in drug. CRC Press, Boca Raton, FL:49.
- O'Fallon JV, Wright RW, Jr. 1986. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 34: 58-64.
- Ohno S, Kaplan WD, Kinosita R. 1959. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp Cell Res* 18: 415-418.
- Overstrom EW. 1992. Viability and oxidative metabolism of the bovine. *Theriogenology* 37: 269-275.

Ozias CB, Stern S. 1973. GLycogen levels of preimplantation mouse embryos developing in vitro. *Biol Reprod* 8: 467-472.

Pabon JE, Jr., Findley WE, Gibbons WE. 1989. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 51: 896-900.

Pai GS, Sprenkle JA, Do TT, Marenzi CE, Migeon BR. 1980. Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 2810-2813.

Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD, Lindenbaum MH. 1995. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet* 11: 40-44.

Parrish JJ. 1986. Bovine in vitro fertilisation with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-597.

Peippo J, Bredbacka P. 1995. Sex-related growth rate differences in mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev* 40: 56-61.

Peippo J, Farazmand A, Kurkilahti M, Markkula M, Basrur PK, King WA. 2002. Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovine embryos. *Mol Hum Reprod* 8: 923-929.

Peippo J, Kurkilahti M, Bredbacka P. 2001. Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. *Zygote* 9: 105-113.

Pérez-Crespo M. 2005. Differential Sensitivity of Male and female mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 72: 502-510.

Pergament E, Fiddler M, Cho N, Johnson D, Holmgren WJ. 1994. Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum Reprod* 9: 1730-1732.

Pool TB. 2002. Recent advances in the production of viable human embryos in vitro. *Reprod Biomed Online* 4: 294-302.

Ray PF, Conaghan J, Winston RM, Handyside AH. 1995. Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 104: 165-171.

Renard JP, Philippon A, Menezo Y. 1980. In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *J Reprod Fertil* 58: 161-164.

Richter C. 1985. Oxidants in mitochondria: from physiology. *Bioch Biophys Acta* 1271:67.

Rieger D. 1992a. Relationships Between Energy Metabolism. *Theriogenology* 37: 75-82.

Rieger D. 1992b. Relationships between energy metabolism and development. *Theriogenology* 37: 75-82.

Rieger D, Grisart B, Semple E, Van Langendonck A, Betteridge KJ, Dessy F. 1995. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. *J Reprod Fertil* 105: 91-98.

Rieger D, Guay P. 1988. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. *J Reprod Fertil* 83: 585-591.

Roach PJ. 1990. Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation. *Faseb J* 4: 2961-2968.

Robinson DH, Benos DJ. 1991. Glucose metabolism in the trophectoderm and inner cell mass of the rabbit embryo. *J Reprod Fertil* 91: 493-499.

Rosenkrans CF. 1994. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *J Anim Sci*, 72:434-440.

Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R. 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71: 383-390.

Salido EC, Li XM, Yen PH, Martin N, Mohandas TK, Shapiro LJ. 1996. Cloning and expression of the mouse pseudoautosomal steroid sulphatase gene (Sts). *Nat Genet* 13: 83-86.

Sansone G, Perroni L, Testa U, Mareni C, Luzzatto L. 1981. New genetic variants of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) in Italy. *Ann Hum Genet* 45: 97-104.

Schini SA, Bavister BD. 1988. Development of golden hamster embryos through the two-cell block in chemically defined medium. *J Exp Zool* 245: 111-115.

Staigmiller RBaM, R.M. 1984. Competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res* 9:221.

Stern S, Biggers JD. 1968. Enzymatic estimation of glycogen in the cleaving mouse embryo. *J Exp Zool* 168: 61-66.

Stryer I. 1989. W.H.Freeman and Co. San Francisco, CA.

Summitt RL, Tipton RE, Wilroy RS, Jr., Martens PR, Phelan JP. 1978. X-autosome translocations: a review. *Birth Defects Orig Artic Ser* 14: 219-247.

Surani MA. 1979. Glycoprotein synthesis and inhibition of glycosylation by tunicamycin in preimplantation mouse embryos: compaction and trophoblast adhesion. *Cell* 18: 217-227.

Takizawa T, Huang IY, Ikuta T, Yoshida A. 1986. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4157-4161.

Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 63: 805-810.

Taylor DM, Ray PF, Ao A, Winston RM, Handyside AH. 1997. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three- to four-cell stage. *Mol Reprod Dev* 48: 442-448.

Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26: 90-100.

Tervit HR. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fert* 30: 493-500.

Thompson JG, McNaughton C, Gasparini B, McGowan LT, Tervit HR. 2000. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *J Reprod Fertil* 118: 47-55.

Thompson JGE. 1990. Effects of glutamine free radical. *Proc Aus Soc Reprod Biol* 22:116.

Thompson JGE. 1996. Effect of oxygen concentration on in vitro culture. *J Reprod Fertil* 89: 573-580.

Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA. 1991. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *J Reprod Fertil* 93: 125-132.

Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL. 2000. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 62: 1866-1874.

Tshimangadzo L. 2004. Bovine blastocyst development in vitro timing, sex and viability following vitrification. *Biolog Reprod*. 71: 1671-6.

Tsunoda Y. 1985. altered sex ratio of live young after transfer of fast and slow developing mouse embryos. *Gamete Res* 12: 301-310.

Valdivia RP, Kunieda T, Azuma S, Toyoda Y. 1993. PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured in vitro. *Mol Reprod Dev* 35: 121-126.

van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A. 1997. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 47: 47-56.

Voet D. 1990. *Biochemistry* (Wiley, New York, NY):747.

Vulliamy T, Mason P, Luzzatto L. 1992. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trends Genet* 8: 138-143.

Wales RG, Hunter J. 1990. Participation of glucose in the synthesis of glycoproteins in preimplantation mouse embryos. *Reprod Fertil Dev* 2: 35-50.

Wales RG, Whittingham DG, Hardy K, Craft IL. 1987. Metabolism of glucose by human embryos. *J Reprod Fertil* 79: 289-297.

Wells PG, Winn LM. 1996. Biochemical toxicology of chemical teratogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31: 1-40.



Woodgett JR. 1991. A common denominator linking glycogen metabolism, nuclear oncogenes and development. *Trends Biochem Sci* 16: 177-181.

Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. 2002. In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod* 66: 127-134.

Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H. 2001. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod* 65: 309-317.

Xu KP, Yadav BR, King WA, Betteridge KJ. 1992. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. *Mol Reprod Dev* 31: 249-252.

Yadav BR, King WA, Betteridge KJ. 1993. Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated in vitro. *Mol Reprod Dev* 36: 434-439.

Zwingman T, Erickson RP, Boyer T, Ao A. 1993. Transcription of the sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 814-817.

# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

## IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Saloua BENMOUISSA		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Reproduction

## DESCRIPTION DES ARTICLES

Auteurs Benmouissa, Saloua, France Fillion et Lawrence C. Smith	
Titre Transient exposure to high oxygen concentrations alters the sex-ratio and the abundance of X-linked transcripts in bovine <i>in vitro</i> cultured embryos	
Revue Molecular Reproduction and Development	État En préparation

## DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que Saloua BENMOUISSA inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Conséquence du stress oxydatif des embryons bovins cultivés in vitro</i>		
Coauteur France Fillion	Signature [REDACTED]	Date 2006 01 30
Coauteur Lawrence C. Smith	Signature [REDACTED]	Date 2006 01 30

